

**Studium des Einflusses von psychotropen
Pharmaka auf den Abbau von intracisternal
injiziertem 5-Hydroxytryptophan-C¹⁴ mit Hilfe von
dünnschichtchromatographischen Methoden
zur Bestimmung von unmarkierten und radioaktiv
markierten Metaboliten des Tryptophans**

Pierre Baumann

1973

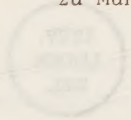


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553805_0029

Studium des Einflusses von psychotropen Pharmaka auf den Abbau von intracisternal injiziertem 5-Hydroxytryptophan-C¹⁴ mit Hilfe von dünn-schichtchromatographischen Methoden zur Bestimmung von unmarkierten und radioaktiv markierten Metaboliten des Tryptophans.

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München



vorgelegt
von
Pierre Baumann
aus
Baden/Schweiz
Oktober 1973



1. Berichterstatter Prof. Dr. F. Lynen
2. Berichterstatter Prof. Dr. N. Matussek

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.1973

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1968 bis Dezember 1971 in der Arbeitsgruppe für Psychopharmakologie der neurochemischen Abteilung des Max-Planck-Institutes für Psychiatrie ausgeführt.

Herrn Prof. Dr. N. Matussek danke ich für die Einführung in das Gebiet der biogenen Amine und für seine wertvolle Mithilfe bei der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. F. Lynen danke ich für die grosszügige Unterstützung zur Durchführung dieser Arbeit.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

E i n l e i t u n g	Seite
I. Übersicht über den Serotoninstoffwechsel und seine Bedeutung	1
Bedeutung des Serotonins	1
Serotonin und Geisteskrankheiten	3
Synthese und Abbau von Serotonin	5
Lokalisierung des Serotoninstoffwechsels	7
Bedeutung und Messung des Umsatzes von Serotonin	10
Einfluss von Drogen auf den Serotoninstoffwechsel	12
II. Analytik der Tryptophanmetaboliten	15
III. Problem- und Zielsetzung der Arbeit	18
H a u p t t e i l	
IV. Entwicklung einer Methode zur densitometrischen Bestimmung von Tryptophan-Metaboliten im Hirn	21
Wahl des geeigneten Laufmittels, Bestimmung der hR_f -Werte	21
Bedingungen zur quantitativen densitometrischen Bestimmung	25
Bestimmung der Ausbeute	41
V. Anwendungen: Densitometrische Bestimmungen von 5-HT und Tryptophan im Rattenhirn	44
VI. Entwicklung einer Methode zur quantitativen Bestimmung von radioaktiv markierten Indolderivaten im Rattenhirn	47

VII.	Anwendung: Bestimmung des Abbauverlaufs von 5-HTP-C ¹⁴ und 5-HT-C ¹⁴ unter verschiedenen Bedingungen	58
	Abbau von 5-HTP-C ¹⁴ im Rattenhirn nach intracisternaler Injektion	58
	Einfluss von Drogen (Pargylin, Ro 4-1284) auf den Abbau von 5-HTP-C ¹⁴	64
	Einfluss von Imipramin auf die Aufnahme und den Abbau von radioaktivem 5-HTP und 5-HT	65
VIII.	Autoradiographie nach Behandlung mit 5-HT-C ¹⁴	76
IX.	Kombination der Methoden zur Bestimmung von 5-HTP-C ¹⁴ , 5-HT-C ¹⁴ , 5-HIAA-C ¹⁴ , Tryptophan, D, L-5-HTP und Serotonin im Rattenhirn	79
X.	Material	85
XI.	Methodik und Beschreibung der Versuche	87
	1. Bestimmung von 5-HTP-C ¹⁴ , 5-HT-C ¹⁴ und 5-HIAA-C ¹⁴ in Hirnhomogenaten	87
	1.A. Aufbereitung des Hirns	87
	1.B. Chromatographie der Extrakte	88
	1.C. Messung der Metabolite	89
	2. Densitometrische Bestimmung von Indolderivaten in Hirnhomogenaten	90
	2.A. Aufbereitung des Hirns	90
	2.B. Chromatographie der Extrakte	91
	2.C. Messung der Chromatogramme	91
	3. Koppelung beider Methoden zur Bestimmung radioaktiver und nicht markierter Metaboliten	92

D i s k u s s i o n

1. Densitometrische Bestimmung	94
2. Bestimmung radioaktiv markierter Verbindungen	98
3. Einfluss von Imipramin auf den Abbau von intra- cisternal injiziertem 5-HT-C ¹⁴ und 5-HTP-C ¹⁴	102

Z u s a m m e n f a s s u n g	106
-------------------------------	-----

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s	108
---	-----

L e b e n s l a u f	117
---------------------	-----

Verwendete Abkürzungen:

5-HT	=	5-Hydroxytryptamin = Serotonin
5-HTP	=	5-Hydroxytryptophan
Try	=	Tryptophan
DMT	=	N,N-Dimethyltryptamin
5-HIAA	=	5-Hydroxyindolessigsäure
IAA	=	Indolessigsäure
ZNS	=	Zentralnervensystem
MAO	=	Monoaminoxidase
DACA	=	p-Dimethylaminozimtaldehyd
DPM	=	Zerfälle pro Minute
IPM	=	Impulse pro Minute
DC	=	Dünnschichtchromatographie
TE	=	Transmission-Emission

Einleitung

I. ÜBERSICHT ÜBER DEN SEROTONINSTOFFWECHSEL UND SEINE BEDEUTUNG

Bedeutung des Serotonins

Serotonin, auch Enteramin genannt, verdankt seine Bezeichnung seinem Vorkommen im Blut und im Verdauungstrakt. 90% der Gesamtmenge dieses Amins befinden sich hier,¹ während etwa 8% in den Blutplättchen gespeichert sind.² Nur etwa 2% des Körperserotonins verteilen sich im Hirn. Bevor überhaupt die Verteilung dieses Amins im Zentralnervensystem (ZNS) genau bekannt war, erkannte man die antagonistische Wirkung der psychotomimetischen Droge LSD auf die Wirkung des Serotonins am glatten Muskel. Dies führte zur Formulierung der Serotoninhypothese von Gaddum (1953) und Woolley und Shaw (1954): Gewisse Geisteskrankheiten wie die Schizophrenie könnten auf einen Mangel an 5-HT im ZNS zurückzuführen sein.

Diese Theorie konnte zwar nicht bestätigt werden, war aber der Ausgang für eine intensivere Untersuchung des Serotoninstoffwechsels.

In den folgenden Jahren hat man denn auch die Bedeutung des Serotonins³ für viele zentral gesteuerte Mechanismen erkannt. Sie basieren alle auf der Vorstellung, dass dieses Amin im ZNS die Funktion einer Überträgersubstanz (Neurotransmitter) erfüllt, wenngleich dies noch nicht eindeutig bewiesen werden konnte. Mit Hilfe der Zentrifugationsmethode konnte man die Anwesenheit von Serotonin in der Nervenendigungsfraktion nachweisen. Später halfen die Elektronenmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie, Serotonin auch optisch in Neuronen nachzuweisen, die daraufhin als serotonerge Neuronen bezeichnet wurden. Durch elektrische Reizung^{4, 5} und unter der Wirkung von Drogen konnten die Nervenendigungen Serotonin freisetzen. Noch Unklarheit be-

steht über die Wirkung des Amins am Rezeptor. Die Erkenntnis der Zusammenhänge zwischen gewissen Funktionen des ZNS und Serotonin ist durch Veränderungen des Aminospiegels, seines Umsatzes und seiner Verteilung gewonnen worden. Mehrere Arbeiten weisen auf die Regulierung des Schlaf- und Wachrhythmus durch die biogenen Amine Noradrenalin und Serotonin hin. Matussek⁶ konnte bei Goldhamstern zeigen, dass das Serotonin in der trophotropen Phase (Schlaf- und Ruhepause) das dominierende Neurohormon im ZNS ist, während das Noradrenalin mit der ergotropen Phase zunimmt. Héry⁷ konnte an Ratten mit markiertem Serotonin nachweisen, dass die erwähnte Zunahme auf einen erniedrigten Umsatz des Amins in der trophotropen Phase zurückzuführen ist. Ein vermehrter Umsatz oder ein grösseres Angebot von freiem Serotonin bewirkt bei Ratten eine Hyperaktivität und eine Erhöhung der Körpertemperatur⁸. Doch stehen diese Ergebnisse im Widerspruch zu den Arbeiten von Jouvet⁹, der mit Serotonin oder dessen Vorstufe bei Katzen Schlaf induzierte. Auch hier besteht ein gewisser Antagonismus zwischen Serotonin und Noradrenalin, da das 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) das Einsetzen der Traum- oder REM-Phase verzögern kann¹⁰, welche über dieses Katecholamin gesteuert wird.

In neuerer Zeit wird dem Abbauprodukt von Serotonin, 5-Hydroxytryptophol, eine Rolle in den Mechanismen des Schlafs zugesprochen^{11, 12}. Dies könnte einige der Widersprüche zwischen der einerseits excitatorischen und andererseits sedativen Wirkung dieses Indolamins erklären.

Die Verteilung des Serotonins hängt mit seinen möglichen Funktionen im ZNS eng zusammen¹³. Das Amin ist hauptsächlich im limbischen System nachzuweisen, wo die Zentren für Hunger, Aggression, Sexualverhalten, Temperaturregulierung und Stimmung gelegen sind¹⁴. Der Serotoninspiegel nimmt in dieser Reihenfolge ab: Hypothalamus, Striatum, Pons, Medulla, Mittelhirn, Cortex, Kleinhirn^{15, 16, 17}. Eine Abnahme des Aminospiegels ist zum Beispiel durch einen Immobilisierungsstress¹⁵, eine

Zunahme hingegen durch den Schwimmstress¹⁹ zu erreichen. Valzelli²⁰ hat jedoch festgestellt, dass "aggressive" Ratten im Immobilisierungsstress einen verlangsamten, "freundliche" hingegen einen erhöhten Serotonin-Umsatz aufweisen.

Serotonin hemmt die Ovulation²¹. Sie soll vom Hypothalamus aus gesteuert werden, der gleichzeitig den höchsten Serotoningehalt hat.

Nach Essman^{22, 23} könnte Serotonin in einer Phase der Fixierung des Gedächtnisses als Mediator wirken.

Aprison²⁴ schreibt: Zusammenhänge zwischen Veränderungen von Serotonin und Veränderungen des Verhaltens (Schlaf, sexuelles Verhalten, Lernen, Aggression) lassen sich am besten durch die Annahme erklären, dass Serotonin, von präsynaptischen Nervenendigungen freigesetzt, als Neurotransmitter oder Modulator agiert.

Serotonin und Geisteskrankheiten

So wie die Experimente zeigen, dass Serotonin im gesunden Organismus eine wichtige Rolle spielt, wird es auch im Zusammenhang mit Geisteskrankheiten genannt. Einige Befunde sprechen dafür, dass Serotonin und Noradrenalin bei den manisch-depressiven Psychosen einen gestörten Stoffwechsel zeigen. Die Catecholamin- und Serotonin-Hypothese der Depression nach Schildkraut und Matussek²⁵ hat ihren Ursprung in der Modelldepression durch Reserpin gefunden. Bei einigen Patienten, mit Reserpin gegen Hochdruck behandelt, traten depressive Zustände auf. In Tierversuchen konnte nachgewiesen werden, dass Reserpin die Noradrenalin und Serotonin enthaltenden Vesikel entleert. Man nahm deshalb an, dass die Depression auf einen Mangel der Amine am Rezeptor zurückzuführen sei. Der Mangel an Serotonin bewirkt nach den bisherigen Befunden eine Stimmungsverschlechterung. Drogen vom Imipramintyp erhöhen den Serotoningehalt am Rezeptor und bewirken eine Stimmungsaufhellung. Die Untersuchungen von Coppen stützen diese Hypothese^{26, 27}: Depressive weisen²⁸

gegenüber Gesunden niedrigere 5-HIAA- und Tryptophan-Spiegel im Liquor auf. Dieser Befund wird von Mendels ²⁹ bestätigt, der jedoch wie Coppen auch bemerkte, dass sich der 5-HIAA-Spiegel durch die Therapie nicht erhöhte. Van Praag unterscheidet jedoch zwischen Depressionen, die auf eine Störung des Serotonin-Stoffwechsels zurückzuführen sind und solchen, die in dieser Hinsicht keine Absonderlichkeiten zeigen ³⁰.

Die bisher erfolgreichste Pharmakotherapie wurde mit Drogen vom Imipramintyp erreicht ^{31, 32, 33, 34}. Die Therapien zielen meistens darauf, den Serotonin-, aber auch den Noradrenalin-Spiegel zu erhöhen: Gabe von Imipramin und Tryptophan ³⁶, MAO-Hemmern alleine oder mit Tryptophan. Doch bleiben auf diesem Gebiete noch viele Fragen offen, da z.B. die Gabe von Tryptophan alleine keine Verbesserung des Krankheitsbildes ergibt ³⁷. Immerhin wird vom eingenommenen Tryptophan normalerweise nur 1 - 2 % zur Synthese von Serotonin ³⁸ verwendet, wobei Tryptophan wiederum nur zu einem 1% ins Hirn gelangt. Im Tierversuch wurde ausserdem gezeigt, dass der Serotoninspiegel auch nach massiver Tryptophangabe nicht über einen bestimmten Grenzwert steigt ³⁹.

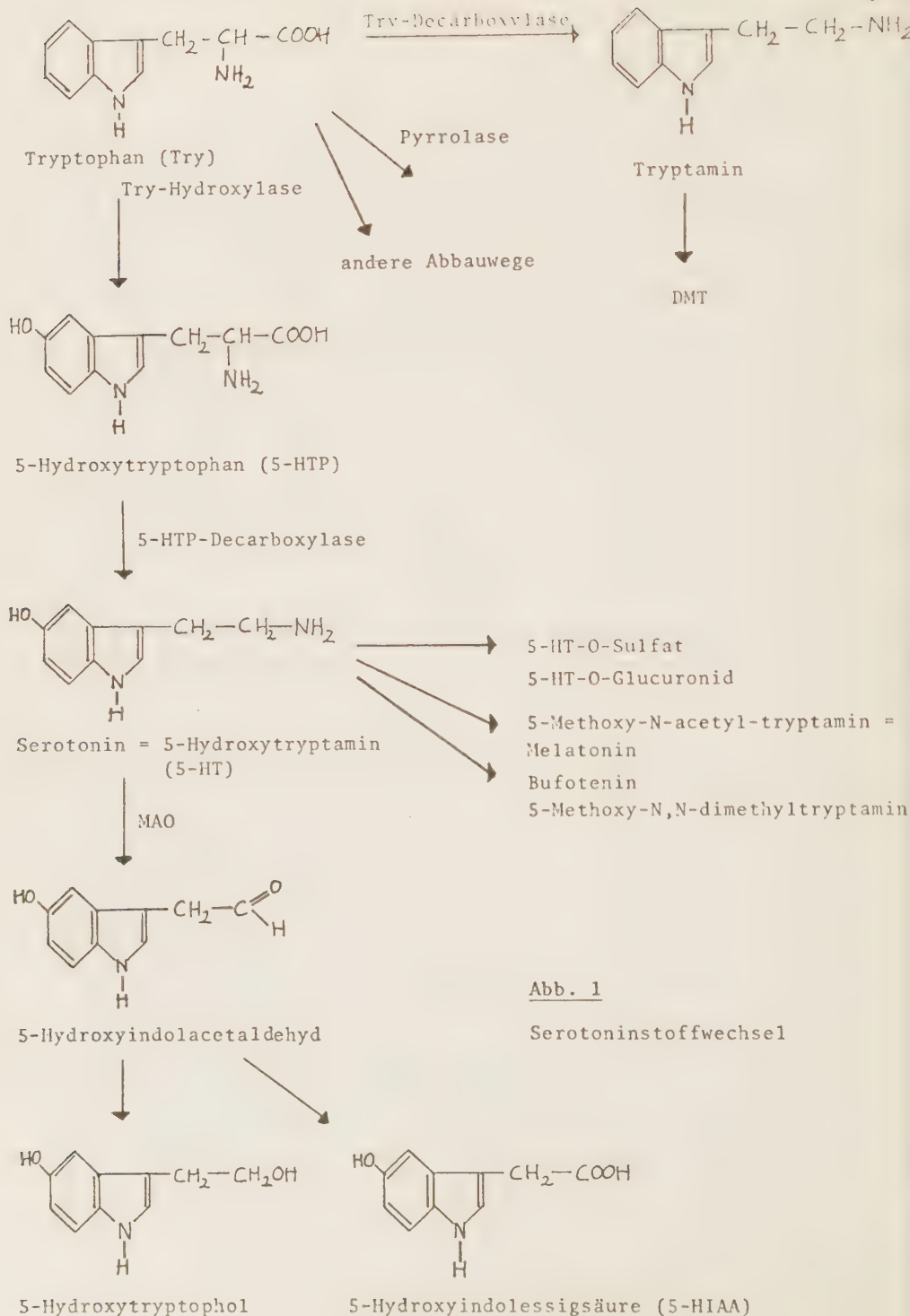
Wenn auch die Theorie von Woolley und Shaw zur Zeit nicht mehr diskutiert wird, so ist doch die Theorie der gestörten Transmethylierung des Serotonins und des Tryptamins im Zusammenhang mit der Schizophrenie in den Vordergrund getreten. Danach macht man methylierte Stoffwechselprodukte dieser Amine für gewisse Symptome der Schizophrenie verantwortlich. Einige Befunde zeigen, dass diese psychotomimetischen Indolamine im Hirn von Tieren ⁴⁰, ⁴¹, im Blut von Schizophrenen ⁴² und im menschlichen Hirn ⁴³ gebildet werden können. Diesen Untersuchungen gehen einige voraus, die auf die mögliche Anwesenheit von Bufotenin, Dimethyltryptamin und 5 Methoxy-dimethyltryptamin im Urin und Blut von Schizophrenen und Gesunden hinweisen ^{44, 45}.

Synthese und Abbau von Serotonin

Im letzten Abschnitt wurde auf einige Erkenntnisse hingewiesen, die die Wichtigkeit von Serotonin im Zusammenhang mit zentral-gesteuerten Mechanismen zeigt. Man hat vergeblich versucht, durch periphere Gabe von Serotonin zentrale Symptome zu provozieren. Carcinomide Darmtumoren produzieren grössere Mengen von Serotonin. Bei diesen Patienten konnten aber keine zentralen Wirkungen beobachtet werden^{46, 47}. Obwohl es auch Untersuchungen mit gegenteiligen Resultaten^{48, 49} gibt, wird doch angenommen, dass die Blut-Hirn-Schranke für das stark wasserlösliche Serotonin undurchlässig ist.

Es ist deshalb anzunehmen, dass das im Hirn gespeicherte Serotonin nicht in der Peripherie synthetisiert wird. Die Abb. 1 zeigt die Synthese und den Abbau von Serotonin.

Die Aminosäuren Tryptophan und 5-Hydroxytryptophan können von der Peripherie durch die Blut-Hirn-Schranke ins Hirn gelangen. Das 5-HTP tritt aber im Organismus nicht in nennenswerten Mengen auf, so dass man annimmt, dass das Serotonin ganz aus vom Blut ins Hirn übergetretenem Tryptophan synthetisiert wird. Wird nämlich 5-HTP peripher appliziert⁵⁰, verteilt es sich im Hirn gleichmässig und unspezifisch. Gibt man hingegen einen peripheren Decarboxylasehemmer allein in einer auch im ZNS wirksamen Dosis, wird 5-HTP im ZNS nachweisbar und zwar in den Zentren, wo hauptsächlich Serotonin auftritt. Auf diese Weise konnte fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden, dass die Hydroxylierung von Try hauptsächlich in serotonergen Neuronen stattfindet. Es muss ausserdem berücksichtigt werden, dass praktisch nur die linksdrehende Form der Aminosäure für die Synthese des Amins in Frage kommt: Höchstens 8 % von d-5HTP können in die l-Form überführt werden⁵¹. Die Transaminase bildet die entsprechende optisch inaktive Ketosäure, die zu einem gewissen Prozentsatz wieder in die l-Form der Aminosäure überführt werden kann.



Das Enzym Tryptophan-Hydroxylase^{52, 53} katalysiert die Bildung von 5-HTP aus Try. Infolge des hohen K_m -Wertes ($1 \times 10^{-4} M$) erfolgt die Reaktion sehr langsam. Dieses Enzym, welches hauptsächlich in der Mitochondrienfraktion vorkommt, benötigt zur Reaktion NADPH und einen Pteridin-Cofaktor. Die grösste Aktivität wurde in der Raphe gemessen⁵⁴. Da das nächste Enzym, die 5-HTP-Decarboxylase, sehr aktiv ist ($K_m = 2 \times 10^{-5} M$), tritt 5-HTP unter physiologischen Bedingungen im Hirn nicht in bestimmbar Mengen auf, auch nicht nach Tryptophan-Belastung⁵⁵. Dieses verhältnismässig unspezifische Enzym Decarboxylase ermöglicht mit Pyridoxalphosphat die Bildung von Serotonin aus 5-HTP⁵⁶. Die Hydroxylierung von Try zu 5-HTP bildet den geschwindigkeitbestimmenden Schritt in der Serotonin-Synthese. Das Enzym ist jedoch nicht abgesättigt, da der endogene Serotoninspiegel innerhalb gewisser Grenzen von der Tryptophankonzentration im Blut⁵⁰ und im Hirn^{8, 59} abhängig ist.

Serotonin wird zum grössten Teil über das Enzym Monoaminoxidase katabolisiert. Das auf diese Weise gebildete Aldehyd wird im ZNS vornehmlich zur 5-Hydroxy-indolessigsäure (5-HIAA) oxydiert. Ein geringer Teil wird reduziert zu 5-Hydroxytryptophol. Das verhältnismässig unspezifische Enzym ist in den Mitochondrien gespeichert.

Die Inaktivierung des Serotonins ist auch durch die Serotoninsulphotransferase möglich⁶⁰. Die Wichtigkeit dieser Reaktion für die physiologischen Vorgänge ist noch eingehender zu untersuchen⁶¹.

Das Hauptabbauprodukt ist dennoch die 5-HIAA, die durch einen aktiven Transportmechanismus aus dem Hirn entfernt wird.

Lokalisierung des Serotoninstoffwechsels

Die Abbildung 2 zeigt das Schema der Bildung, des Abbaus, der Freisetzung von Serotonin im ZNS. Es muss jedoch einschränkend

Synapse

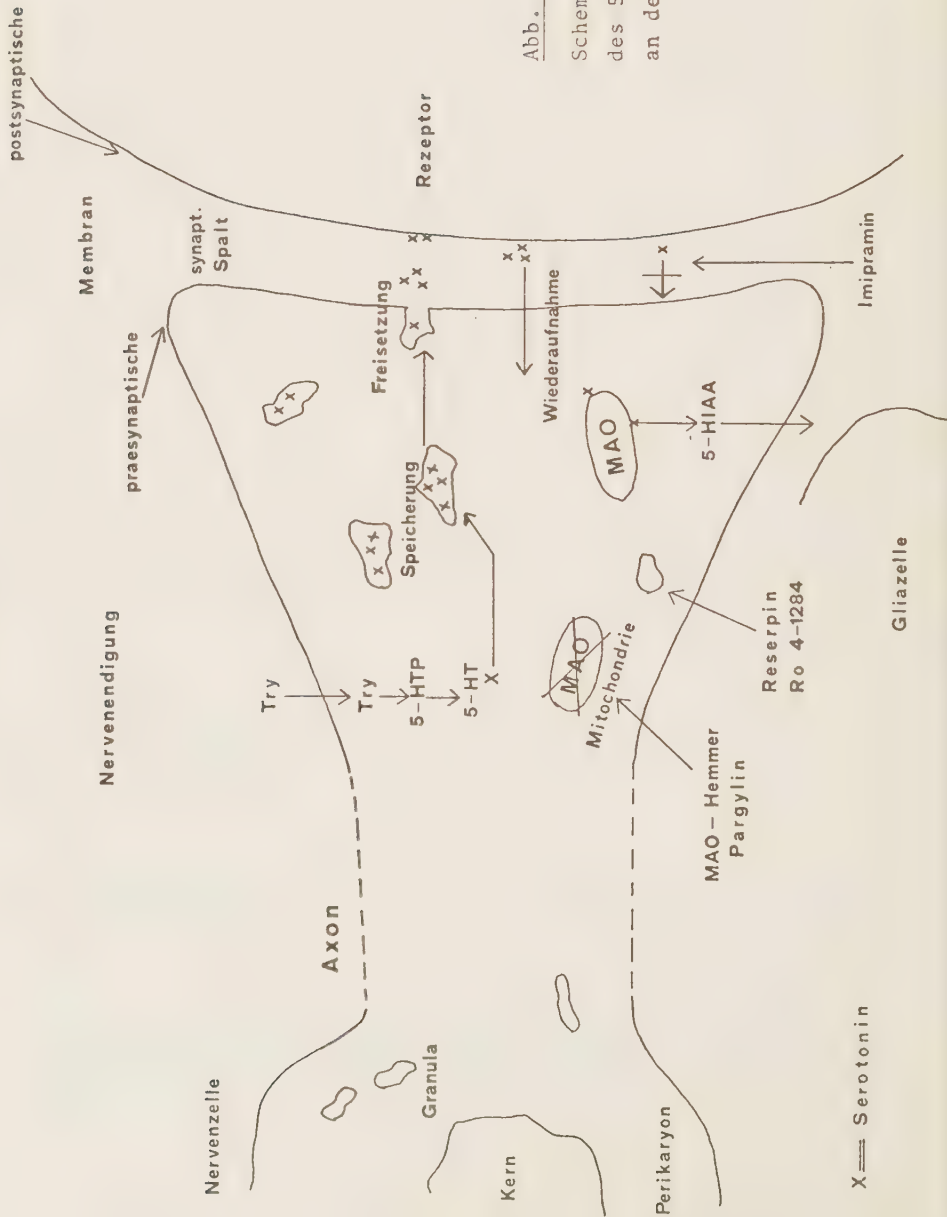


Abb. 2

Schematische Darstellung des 5-HT-Stoffwechsels an der Synapse.

gesagt werden, dass der vollständige Beweis für die Wirkung des Serotonins als Neurotransmitter noch fehlt. Nach Mc Lennan⁶² sind dazu folgende Voraussetzungen Bedingung:

1. Das Transmitter-Molekül muss von der Nervenendigung infolge der Aktivität des Nerven freigesetzt werden.
2. Das Molekül muss die synaptische Stimulation imitieren, wenn es direkt appliziert wird.
3. Ist von einer pharmakologischen Substanz die Interferenz mit dem synaptischen Prozess bekannt, so sollte sie ebenfalls mit dem exogen zugeführten Molekül interferieren.

Arbeitsgruppen um Aghajanian, de Robertis und Whittaker ist es gelungen, die Speicherung der Amine in sogenannten synaptischen Vesikeln nachzuweisen^{63, 64}. Diese Vesikel werden im Kerngebiet synthetisiert und wandern durch das Axon bis zur Nervenendigung⁶⁵. Das meiste Serotonin wird wahrscheinlich erst dort synthetisiert, doch ist schon in Kerngebieten und Axonen die charakteristische gelbe Fluoreszenz von Serotonin sichtbar¹³. Es wurde auch der axonale Transport der Tryptophan 5-Hydroxylase nachgewiesen⁶⁶. Das synthetisierte Serotonin wird wahrscheinlich in den Vesikeln in Form eines ATP-Mg-5-HT-Komplexes⁶⁴ gespeichert.

Für die Freisetzung, die chemisch oder durch einen Nervenreizimpuls erfolgen kann, gibt es verschiedene Modelle. Das ältere postuliert eine erste Freisetzung innerhalb der Nervenendigung, gefolgt von einer Ausschüttung in den synaptischen Spalt. In Erwägung gezogen wird auch der Mechanismus über die sogenannte Exocytose, wonach die Speichergranula an der präsynaptischen Membran ihren gesamten Inhalt freisetzen.

Aghajanian⁶⁷ konnte die Freisetzung des Serotonins durch elektrische Stimulierung mit Hilfe einer Mikroelektrode erwirken. Die chemische Freisetzung des Amins durch Drogen des Typs Reserpin gelang schon vor längerer Zeit⁶⁸.

Das Amin gelangt nun an den "Rezeptor". Vom Noradrenalin ist bekannt, dass es postsynaptisch die Bildung von zyklischem AMP bewirkt⁶⁹. Ein solcher Mechanismus ist für das Serotonin noch

nicht nachgewiesen worden ⁷⁰. Im Hinblick auf Interaktionen zwischen Amin und Rezeptor hat man sich bisher hauptsächlich auf Modelle beschränkt, die Berechnungen der möglichen Konformationen ⁷¹ des Serotonins und seine Fähigkeit, charge-transfer-komplexe einzugehen ⁷², berücksichtigen. Durch das Indolamin soll die Konfiguration der Rezeptormoleküle geändert werden. Dieses könnte eine Veränderung der Durchlässigkeit der postsynaptischen Membran für Ionen herbeiführen.

Die Gliazellen können einen Teil des Serotonins aufnehmen ⁷³. Es könnte hier ein Abbau des Amins durch die MAO stattfinden. Der grösste Teil des freigesetzten Amins wird hingegen wieder in die Nervenendigung aufgenommen und in den Vesikeln gespeichert, wenn es nicht vorher von der MAO der Mitochondrien katabolisiert wird.

Bedeutung und Messung des Umsatzes von Serotonin

Die Fluoreszenz-Histochemie gibt wertvolle Hinweise auf die regionale und zelluläre Verteilung der Transmitter. Die biochemischen Methoden dienen zunächst dazu, die vorhandenen Substanzen qualitativ und quantitativ zu charakterisieren. Einfache Konzentrationsbestimmungen genügen aber oft nicht, komplizierte Mechanismen zu erklären. So wird z.B. beim REM-Schlaf-Entzug sowohl die Synthese wie auch der Abbau des Serotonins beträchtlich gesteigert ⁷⁴, so dass der Serotoninspiegel sich kaum verändert, wohl aber der Umsatz.

Es gibt mehrere Definitionen des Turnovers ^{75, 76, 77}. Nach Seiler ⁵⁶ und Zilversmit ⁷⁷ ist die Umsatzgeschwindigkeit (Turnover) eines Amins im Hirn ein Mass dafür, wie schnell der insgesamt vorhandene Pool (Speicher) ersetzt wird. Diese Umsatzgeschwindigkeit hängt mit der neuronalen Aktivitätsrate eng zusammen ⁷⁸.

Aus methodischen Gründen müssen zur Umsatzberechnung vereinfachende Modelle verwendet werden. So wird als Pool oft eine ganze Hirnregion oder sogar das Gesamthirn bezeichnet. Es ist aber wahrscheinlich, dass hier Umsatzberechnungen Mittelwerte

aus einer Summe von Speichern mit verschiedenen Umsatzraten ergeben. Der Umsatz ist hierbei abhängig von der Synthese, der Aufnahme, der Wiederaufnahme und der Freisetzung der Amine.

Es ist noch nicht restlos geklärt, ob die Synthese des Amins durch Endprodukthanhäufung gehemmt wird. Nach Millard ⁷⁹ bewirkt eine Hemmung des Abbaus von Serotonin durch einen MAO-Hemmer keine Hemmung der Synthese auf der Stufe Tryptophan-5-Hydroxytryptophan. Demgegenüber wird nach Mâcon ⁸⁰, Moir ⁵⁵ und Hamon ⁸² in diesem Fall die Aminosynthese durch einen negativen Feedback-Mechanismus gehemmt. Aber gerade die Verwendung eines MAO-Hemmers bildet den Kern einer Methode zur Bestimmung des Turnovers. Der Anstieg des Amins und der Abfall seines Abbauproduktes 5-HIAA nach dieser Droge ^{82, 83} erlauben die Berechnung des Umsatzes des Amins.

Es werden folgende ähnliche Methoden zur Umsatzbestimmung beschrieben ⁷⁸:

1. Gabe eines MAO-Hemmers
2. Gabe eines Hemmers der Try-Hydroxylase (z.B. p-Chlorphenylalanin). Die Abnahme des Serotonins nach dieser Droge gibt das Mass für die Aminosynthese der Kontrolltiere.
3. Probenecid hemmt den Abtransport der 5-HIAA aus dem Hirn. Aus dem Anstieg der 5-HIAA im Liquor und im Hirn bei den vorbehandelten Tieren kann der Abbau des Serotonins berechnet werden ^{84, 85}.

Es ist möglich, dass diese Drogen den Umsatz des Amins selber beeinflussen. So erniedrigt Probenecid den Tryptophan-Spiegel im Serum, erhöht ihn im Hirn, verändert aber die Serotoninsynthese nicht ⁸⁶. Die mit den verschiedenen Methoden erhaltenen Ergebnisse stimmen aber miteinander überein ⁸⁷.

Der Einsatz von radioaktiv markierten Verbindungen ermöglicht die genauesten Umsatzbestimmungen. Zudem wird der Stoffwechsel des endogenen Serotonins gering beeinflusst. Daneben erlaubt diese Technik zusätzlich Aussagen hinsichtlich Synthese, Verteilung, Speicherung und Abbau in vivo. So wurde zum Beispiel das Tryptamin erst vor kurzem in kleinsten Mengen im Hirn ent-

deckt ⁴⁰, obwohl alle notwendigen Enzyme zu seiner Synthese zur Verfügung stehen. Wird es in Form eines radioaktiven Derivates injiziert, so wird eine Halbwertszeit von fünf Minuten gemessen. Für Serotonin gilt dies nur nach Vorbehandlung der Tiere mit Reserpin ⁶⁸, das die Speicherkapazität der synaptischen Vesikel für das biogene Amin herabsetzt. Es konnte also mit Isotopen nachgewiesen werden, dass die praktische Abwesenheit von Tryptamin im Hirn auf mangelnde Speicherung zurückzuführen ist.

Die Halbwertszeit von Serotonin im Hirn beträgt zwischen 20 Min. und 4 Stunden. Die erheblichen Unterschiede erklären sich damit, dass Serotonin nach 5-HTP- oder Serotoningabe nicht nur in serotonergen sondern auch in noradrenergen Nervenendigungen gespeichert werden kann.

Einfluss von Drogen auf den Serotoninstoffwechsel

Es wird nicht nur Tryptophan zur Therapie von Schizophrenie und Depression, sondern auch 5-HTP empfohlen ⁹⁰. Die Therapie der Schizophrenie durch Tryptophan und einen MAO-Hemmer wurde für möglich gehalten ⁹². Doch wird meistens eine Verschlechterung des Krankheitsbildes beobachtet ⁹¹.

Die Wirkungsweise von Reserpin und MAO-Hemmern auf den Stoffwechsel des Serotonins im zentralen Nervensystem ist besser bekannt als die tricyclischer Antidepressiva.

Die MAO-Hemmer, die in der Therapie wegen ihrer antriebssteigernden Komponente ⁹³ verwendet werden, verhindern nicht nur den Abbau des Serotonins, sondern auch den des Noradrenalin. In der Grundlagenforschung sind die MAO-Hemmer wertvoll für Turnoverbestimmungen der biogenen Amine. Perez-Cruet ⁹⁴ injizierte Ratten den MAO-Hemmer Pargylin i.p., um vom Abfall der 5-HIAA auf den Umsatz von Serotonin zu schließen. Nach 25 mg/kg i.v. ist bei Inkubationsversuchen schon eine Stunde nach der Injektion

eine vollständige Enzymhemmung durch Pargylin feststellbar ⁹⁵. Die Droge geht mit dem Enzym Monoaminoxidase (EC 1.4.3.4.) eine kovalente Bindung ein ⁹⁶.

Eine gegensätzliche Wirkung in Bezug auf den Amingehalt des Hirnes üben die Drogen vom Typ Reserpin oder Benzochinolizin aus. Sie setzen die Speicherfähigkeit der synaptischen Vesikel für die Amine herab. Halaris ⁹⁷ konnte mit einer elektronenmikroskopischen Methode die Entleerung der Speichergranula von 5-HT und NA durch das Benzochinolizinderivat Ro 4-1284 nachweisen. Die sedative Wirkung tritt nach Ro 4-1284 schneller ein als nach Reserpin. Die Wirkung von Reserpin auf die Speicher ist irreversibel. Es dauert Wochen bis zur Restaurierung des ursprünglichen Amingehalts ⁹⁸, die erst wieder mit Bildung neuer Vesikel einsetzt.

Vergleicht man die MAO-Hemmer mit den tricyclischen Antidepressiva bezüglich ihres antidepressiven Wirkungsspektrums, so sieht man, dass bei den MAO-Hemmern die antriebssteigernde, bei den tricyclischen Antidepressiva die stimmungsaufhellende Komponente vorherrscht.

Mit Imipramin ist der Medizin der Durchbruch in der Behandlung der endogenen Depression gelungen. Aus dieser Droge wurden weitere verwandte Verbindungen hergestellt, die zum Teil bessere therapeutische Wirkungen aufweisen, wie: Desipramin, Amitryptilin, Chlorimipramin. Dennoch ist das Imipramin am eingehendsten untersucht worden. So liegen von Domenjoz ⁹⁹ umfassende pharmakologische Untersuchungen vor. 1970 erschien von Angst ¹⁰⁰ und Theobald ein Übersichtswerk mit 4.500 Referenzen über dieses Pharmakon. Trotz dieser Flut von Literatur ist man sich über die biochemische Wirkungsweise der Thymoleptika noch nicht einig. Kielholz teilt die Antidepressiva in tertiäre, die die Stimmung aufhellen, und sekundäre, die den Antrieb erhöhen. Die biochemischen Ergebnisse deuten daraufhin, dass Imipramin (ein tertiäres Amin), auf den Serotonin-, Desipramin (ein sekundäres Amin) auf den Noradrenalinstoffwechsel wirkt:

Die Drogen vom Imipramintyp sollen die Wiederaufnahme des freigesetzten Serotonins in die Nervenendigung hemmen (Abb. 2), sowohl in vitro ^{101, 102} wie auch in vivo ^{103, 104, 105}.

Dieser Mechanismus verhindert die Speicherung des Amins und somit den Schutz vor dem abbauenden Enzym MAO. Hiermit ist eine Abnahme des Aminspiegels im Hirn unter dem Einfluss der Droge zu erwarten.

Imipramin soll auch den das Serotonin freisetzenden Nervenreizimpuls hemmen ¹⁰⁶. Auf diese Weise wird der Umsatz des Amins herabgesetzt. Es ist deshalb nicht verwunderlich, wenn die Einflüsse des Imipramins auf den Serotoninstoffwechsel in vivo-Versuchen schwer zu erkennen sind.

II. ANALYTIK DER TRYPTOPHANMETABOLITEN

Bevor die Bedeutung und das Vorhandensein von Serotonin im ZNS bekannt war, kannte man seine kontrahierende Wirkung am glatten Muskel. Darauf stützt sich denn auch die erste Nachweismethode. Sie ist zwar sehr empfindlich, doch nicht sehr spezifisch, da auch andere Stoffe eine ähnliche Wirkung hervorrufen.

In letzter Zeit wurden gaschromatographische und massenspektrometrische Methoden vorgeschlagen ^{112, 113, 114}, doch liegen bis jetzt nur wenige Anwendungen für tierisches Gewebe vor. Ausserdem ist die gekoppelte Gaschromatographie-Massenspektrometrie äusserst kostspielig.

Durchgesetzt und bewährt haben sich die fluorimetrischen Methoden, wobei jedoch eine Vortrennung der Indolderivate mit Aluminiumoxyd- ¹¹⁰ oder Ionenaustauscherkolonnen ¹¹¹ notwendig ist, da z.B. die Eigenfluoreszenz von Serotonin in 3 nHCl bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm nicht sehr spezifisch ist. Noch 10 ng Serotonin oder 5-HIAA können fluorimetrisch bestimmt werden, wenn sie mit o-Phthalaldehyd gekoppelt werden ^{108, 109}.

Parallel dazu wurde versucht, die Dünnschichtchromatographie für diese Probleme weiterzuentwickeln. Sie hat sich zuerst als qualitatives Hilfsmittel durchgesetzt, indem sie die Vortrennung eines Substanzgemisches auf rasche und einfache Weise erlaubte. Die zu analysierenden Stoffe können hernach von den Dünnschichtplatten ausgekratzt, eluiert und mit den herkömmlichen Methoden gemessen werden ^{115, 116, 117, 118}.

Es gibt jedoch keine Bestimmung von Serotonin im tierischen Gewebe nach Vortrennung auf Dünnschichtplatten und Elution der Flecken. Es wird auch nicht über eine in situ Auswertung der Flecken berichtet. Dies liegt unter anderem daran, dass die dazugehörenden Messgeräte noch nicht lange im Handel sind. Die

in situ Messung besteht darin, fluoreszierende oder absorbierende Flecken mit entsprechenden Zusatzgeräten zum Fluorimeter oder Spektrophotometer direkt auf der Platte zu messen. In diesem Zusammenhang werden folgende Anwendungen beschrieben: Bestimmung von Lipiden im Gewebe ¹¹⁹, Harnstoff ¹²⁰ und Katecholaminen ¹²¹ im Harn.

Die Bestimmung von Indolderivaten mittels Dünnschichtchromatographie beschränkt sich meistens auf die qualitative Analyse ^{122, 123, 128}, obwohl sehr empfindliche Reagenzien für diese Verbindungsklasse beschrieben werden. Die Behandlung der Dünnschichtplatten mit Paraformaldehyd erlaubt die Sichtbarmachung von 10 ng Serotonin ¹²⁴. Doch wird das Verfahren nicht für Gewebeproben angewendet. Mit dem p-Dimethylaminobenzaldehyd-Reagens können noch 100 ng Serotonin ¹²⁵ erfasst werden.

Harley-Mason ¹²⁶ färbte Serotonin auf Papierchromatogrammen mit p-Dimethylaminozimtaldehyd (DACA) an. Sein Eindruck war, dass dieses Reagens das Ehrlich-Reagens in der Empfindlichkeit um das 10-fache übertrifft.

In der Folge wurde das DACA-Reagens zur Bestimmung von 4-Aminoantipyrin in Küvetten verwendet ¹²⁷. Nach dem Handbuch von Stahl können auf dem Dünnschichtchromatogramm noch 500 ng Serotonin sichtbar gemacht werden. In Vorversuchen wurde bei uns jedoch festgestellt, dass dieses Reagens auf Cellulose weit empfindlicher ist, etwa vergleichbar mit Methoden, die auf fluorimetrischer Basis beruhen. Es bot sich hier die Möglichkeit, eine Variante zu den fluorimetrischen Methoden, basierend auf der densitometrischen Messung der Reaktionsprodukte, auszuarbeiten. Sie hätte die Vorteile gegenüber der colorimetrischen Messung von gelösten Farbstoffen, dass ein Aufarbeitungsschritt, nämlich die Elution der Flecken, gespart würde, und dass sie empfindlicher wäre, da keine Verdünnung durch Lösungsmittel vorgenommen würde.

In den letzten Jahren hat sich die Messung von Isotopen durchgesetzt. Diese Technik kann als analytisches Hilfsmittel herange-

zogen werden, indem Metaboliten mit radioaktiven Reagenzien derivatisiert werden. Nach Reinigung des Präparates kann die gemessene Radioaktivität Auskunft geben über die Menge der zu bestimmenden Substanz. Eine solche Methode zur Bestimmung von Serotonin mittels radioaktiven Acetanhydrid wird von Matthias beschrieben¹²⁹. Häufiger jedoch wird die Isotopenverdünnungsmethode verwendet^{130, 131, 132}.

Markierte Verbindungen eignen sich nicht nur für die Analytik, sondern auch für Stoffwechseluntersuchungen. Diese Methode zur Aufklärung des Metabolismus von Tryptophan ist gebräuchlich für die Bestimmung des Umsatzes, sowie für die Verfolgung der Abbauewege und Bestimmung seltener Metaboliten^{133, 134}. Mit den üblichen Methoden ist zum Beispiel die Bildung von 5-Hydroxytryptophol im Hirn kaum nachzuweisen. Mit radioaktiv markiertem Serotonin kann die Synthese dieses Alkohols selbst in der Epiphyse nachgewiesen werden¹³⁴. Die Methode beruht auf der Auftrennung der Stoffwechselprodukte mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie. Zeigt sich die densitometrische Methode zur Bestimmung der Metaboliten von Tryptophan geeignet, so müsste sie auch die Analyse von markierten Verbindungen ermöglichen.

III. PROBLEM- UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Die Anwesenheit und das Verhalten der biogenen Amine Noradrenalin und Serotonin im Zentralnervensystem deuten auf ihre mögliche Funktion als Neurotransmitter. In manchen Geisteskrankheiten wie im manisch-depressiven Irresein zeigt ihr Stoffwechsel deutliche Veränderungen. In diesem Zusammenhang wurde der Noradrenalin-stoffwechsel bisher gründlicher untersucht, wobei der Serotonin-metabolismus weniger intensiv erforscht wurde. Veränderungen des Serotoninspiegels allein geben oft zu wenig Auskunft über die wirklichen Stoffwechselvorgänge. Es ist von Vorteil, auch die Vorstufen und Abbauprodukte zu beobachten. Dem Amin werden gewisse therapeutische Effekte in der Depression oder gar Schizophrenie⁹⁰ zuerkannt. Wegen der Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für diese Verbindung wird ihre Vorstufe appliziert. Dies kann sowohl peripher wie zentral geschehen, doch ist letztere Möglichkeit vorzuziehen, um zu hohe Verdünnungen zu vermeiden. In dieser Arbeit soll deshalb über die Verteilung und den Abbau von 5-HTP nach zentraler Applikation bei Ratten berichtet werden. Ausserdem soll der Einfluss von psychotropen Pharmaka auf den Stoffwechsel dieser Aminosäure untersucht werden.

In Anlehnung an die bisherigen Arbeiten des Labors sollten nicht nur Fragen des Serotoninstoffwechsels sondern auch methodische Punkte berücksichtigt werden:

1. In unserem Labor wurde eine Methode zur Bestimmung der Metaboliten von radioaktivem Noradrenalin nach intracisternaler Injektion des Amins bei Ratten entwickelt. Nach dem gleichen Prinzip soll die Analyse von 5-HTP-Abbauprodukten ermöglicht werden nach entsprechender Umarbeitung der bestehenden Methode.
2. Sie soll für Probleme verschiedenster Art anwendbar sein: Einfluss von Drogen auf den Abbau von 5-HTP und Serotonin, Turnoverbestimmungen. Es soll deshalb auch die Verteilung der radioaktiv markierten Indolderivate mit Hilfe der Autoradiographie im Rattenhirn verfolgt werden.

3. Die Methode soll getestet werden, indem der Einfluss von in der Wirkung bekannter Drogen auf die Zusammensetzung der 5-HTP-Abbauprodukte untersucht wird.
4. Betrachtet man 5-HTP als Therapeutikum, so ist die Kenntnis seiner "Pharmakokinetik" von Wichtigkeit. Sein Abbau soll während mehreren Stunden verfolgt werden, um einige Aussagen über die Speicherung des Serotonins zu erhalten. Es sollen jeweils die Konzentrationen von 5-HTP, 5-HT und 5-HIAA gemessen werden.
5. Das Antidepressivum Imipramin hemmt die Wiederaufnahme von Serotonin in die Nervenzelle und verlangsamt seinen Turnover. Einige Versuche sollen den Zweck haben, den Einfluss dieser Droge auf die Aufnahme des 5-HTP und 5-HT nach deren intracisternalen Injektion zu prüfen.

Bei der Ausarbeitung der obigen Methode wurde die aussergewöhnliche Empfindlichkeit des in der Dünnschichtchromatographie verwendeten Sprühreagens p-Dimethylaminzimtaldehyd für Indolverbindungen erkannt.

Es sollten nicht nur seine Eigenschaften für die qualitative Analyse beschrieben, sondern auch die Möglichkeit für seine Verwendung in der quantitativen Bestimmung von Tryptophanmetaboliten untersucht werden:

1. Es sollten die Bedingungen zur quantitativen densitometrischen Messung der Reaktionsprodukte auf der Dünnschichtplatte festgelegt werden: Empfindlichkeit, Standardisierung, Ausschalten von Störsubstanzen, Linearisierbarkeit der Eichkurven etc.
2. Die Methode sollte für die Bestimmung von gewissen Indolverbindungen im tierischen Gewebe verwendbar sein.
3. Durch eine Koppelung der beiden Methoden soll eine einfache Möglichkeit gegeben sein, im Tierhirn gleichzeitig exogene radioaktive und endogene nicht markierte Verbindungen zu bestimmen. Dies würde das Studium des Einflusses von zugeführtem 5-HTP auf den endogenen Serotoninstoffwechsel ermöglichen.

Eine solche Methode wäre wertvoll, da sie die gleichzeitige Bestimmung von mehreren Metaboliten einbezieht. Im Aufwand wäre sie verhältnismässig einfach. Kleinere Abänderungen würden ihre Anwendung für Blut- oder Harnuntersuchungen ermöglichen. Sie wäre auch zur Überwachung von Zwischenschritten während der Aufarbeitung von organischem Material bei Verwendung von anderen Detektionsmitteln (Gaschromatographie, Massenspektroskopie) verwendbar.

Hauptteil

IV. ENTWICKLUNG EINER METHODE ZUR DENSITOMETRISCHEN BESTIMMUNG
VON TRYPTOPHAN-METABOLITEN IM HIRN

Der erste Schritt besteht in der Aufbereitung des Gewebes. Sie wird hier nur kurz beschrieben, da im Kapitel "Bestimmung von radioaktiven Metaboliten des 5-HTP im Gehirn" näher darauf eingegangen wird. Sie wird im Kapitel "Beschreibung der Versuche" näher erläutert. Hier folgt zur besseren Übersicht nur eine kurze Beschreibung der gesamten Methode: Pro Gramm Gewebe werden 1,5 ml Methanol zum Homogenisieren genommen. Die Zentrifugation bei 31 000 g gibt ein die Amine etc. enthaltendes Extrakt, das mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie weiter aufgetrennt werden kann. Ein Aliquot des Extraktes wird mit Hilfe des Gerätes von Waessle-Sandhoff auf eine Cellulose-Platte aufgetragen. Es werden zusätzlich Eichsubstanzen appliziert. Die Platte wird im Laufmittel Butanon-(2) -Aceton -2,5 n Essigsäure (40:20:20) bei einer Laufstrecke von 12 cm entwickelt. Das Chromatogramm wird schnell getrocknet und mit dem DACA-Reagens (Herstellung s.u. Beschreibung der Versuche) gleichmässig, jedoch nicht bis zur Transparenz besprüht. Die Indolverbindungen erscheinen als blaue oder violette Flecken. Sie können nun mit dem Chromatographiezusatzgerät von Zeiss gemessen werden. Zur quantitativen Bestimmung werden sie mit den Eichflecken verglichen.

Im folgenden wird auf die Punkte eingegangen:

1. Auswahl des Laufmittels für die Dünnschichtchromatographie.
2. Bedingungen zur quantitativen densitometrischen Bestimmung.
3. Bestimmung der Ausbeute.

Wahl des geeigneten Laufmittels, Bestimmung der hR_f -Werte

Das von Giese ¹³⁶ zur Auftrennung von Metaboliten des Noradrenalins verwendete Laufmittel mit der Zusammensetzung n-Butanol - 5 n Es-

sigsäure (100:35) eignet sich, wie später gezeigt wird, zur Auftrennung von radioaktiv markierten Metaboliten des 5-HTP auf Cellulose. Die densitometrische Bestimmung dieser Indol-derivate war unter diesen Umständen nur begrenzt möglich, da das für unsere Untersuchungen wichtige Serotonin den fast gleichen R_f -Wert aufweist wie der ebenfalls im Hirn vorkommende Harnstoff. Diese Verbindung gibt mit DACA einen intensiv roten Farbstoff. Mit Hilfe von Chromatogrammen auf Glasplättchen (3cm x 10cm) in Einmachgläsern versuchten wir etwa 60 verschiedene Zusammensetzungen von Lösungsmitteln. Dabei zeigte es sich, dass die leicht angesäuerten, alkoholischen (Methanol, Aethanol, i-Propanol, n-Butanol) Laufmittel für unsere Methode ungeeignet sind. Die Flecken erscheinen auch in den mittleren hR_f -Bereichen ziemlich diffus. Die densitometrische Messung wird erschwert, da die Absorption pro Flächenheit gering ist und die Peaks flacher werden. Sie heben sich schlecht vom Untergrund ab und erhöhen die Fehler bei der Ausmessung der Kurven.

Auf die Anwendung von alkalischen Laufmitteln wurde verzichtet, obwohl durch sie gut messbare Flecken erhalten werden. In der Literatur wird aber wiederholt auf die Empfindlichkeit der Indol-¹⁶⁴verbindungen gegenüber basischen Lösungsmitteln hingewiesen. Alkalische Laufmittel müssen zudem vor dem Besprühen der Platten vollständig entfernt werden, da z.B. Pyridin oder Ammoniak einen gelben bis roten Untergrund verursachen, der die Messung erheblich stört.

Die Möglichkeit, anorganische Laufmittel zu verwenden, wurde ebenfalls verworfen: Die Cellulose bröckelte in einer wässrigen 20 %igen KCl-Lösung ab.

Das Trennprinzip auf Cellulose beruht weniger auf Adsorption, denn auf der Verteilung der Substanzen zwischen einer organischen und einer wässrigen Phase. Als weitere organische, mit Wasser mischbare Lösungsmittel empfahlen sich die Ketone. Wir erprobten deshalb die Trenneigenschaften von verschiedenen Kombinationen

mit Wasser-Essigsäure-Aceton für Serotonin, Tryptophan und Harnstoff. Nach dem Anfärben wurden scharf umgrenzte Flecken erhalten. Die R_f -Werte lagen aber für das Serotonin zu hoch. Unter diesen "sauren" Bedingungen liegt das Amin durch die Protonierung des Stickstoffs der Seitenkette als Salz vor. Die wässrige Phase haftet stärker an der Cellulose als die organische Komponente des Laufmittels. Es wurde deshalb erwartet, dass das in Salz-Form vorliegende Amin besser an die Cellulose gebunden würde. Dennoch war, wie die R_f -Werte beweisen, die Löslichkeit von Serotonin im verhältnismässig hydrophilen Aceton zu hoch. Die höher molekularen Ketone Butanon und Cyclohexanon erbrachten aber zu niedrige Laufstrecken für Serotonin. Eine Mischung von n-Butanon und Aceton erwies sich als vorteilhaftestes Gemisch.

In manchen Fällen erwies sich aber die faserförmige Cellulose von Macherey und Nagel als ungeeignet, da für das Serotonin zeitweise Doppelflecken im Abstand von etwa einem cm auftraten. Es wurde beobachtet, dass das Laufmittel oberhalb des R_f -Wertes von Serotonin schneller verdampfte als unterhalb. Es findet deshalb während der Chromatographie eine Phasentrennung statt, wobei die tiefer siedende, organische Phase bis zur eigentlichen Front läuft. Die wässrige Phase bildet weiter zurückliegend eine zweite "Front". Ein Serotonin-Fleck liegt zwischen der ersten und zweiten, der andere innerhalb der ersten Front. Dieses Phänomen trat mit mikrokristalliner Cellulose nicht auf, weshalb von nun an dieses Adsorptionsmittel verwendet wurde. Die R_f -Werte änderten sich nicht wesentlich. Die Trenneigenschaften waren sogar besser, da selbst die optischen Isomeren von DL-5-HTP und DL-Tryptophan getrennt werden konnten.

Die Tabelle 1 zeigt die hR_f -Werte für verschiedene Verbindungen nach der Chromatographie auf Avicel-Cellulose (mikrokristallin) mit dem Laufmittel Butanon-(2) - Aceton - 2,5 n Essigsäure (40:20:20). Die reinen Verbindungen werden meist in einem Gemisch Methanol/Wasser gelöst. Die Endkonzentration beträgt 1-100 ng/ μ l. Aufgetragen werden je nach Problemstellung 1-50 μ l der Eichlösungen.

Verbindung	hR _f		Farbe
	B	A	
1. D-5-HTP	28		blau
2. D,L-5-HTP	23;27	15	blau
3. L-TP	46		lila
4. D,L-Try	45;50	33	lila
5. Harnstoff	54	40	rot
6. Serotonin	64	35	blau
7. 5-HIAA	98	85	blau
8. D-L-Kynurenin	32;40		lila
9. Tryptamin	65	71	lila
10. Bufotenin	72	47	blau
11. DMT	77	72	lila
12. Melatonin	98	98	blau
13. IAA	98	98	lila
14. 5-MeOIAA	98	98	blau

Tab . 1

Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Indol-Verbindungen. Anfärbung mit DACA-Reagens.

B: Butanon-(2)-Aceton - 2,5n Essigsäure (40:20:20) auf mikrokristalliner Cellulose.

A: Butanol-(1) - 5n Essigsäure (100:35) auf faserförmiger Cellulose.

Die Verbindungen 1-7 sind die im Gesamthirn in nennenswerten Mengen vorkommenden Indolderivate und Harnstoff. Auffallend ist, dass die in apolarer Form vorliegenden Säuren nicht getrennt werden können, sondern mit der Front laufen. (Tab. 1)

In einem letzten Versuch (Abb. 3) wird gezeigt, dass das Laufmittel: Propanol-(2) - 5n Essigsäure - Chloroform - Wasser - Methanol (50:1:50:10:5) Harnstoff und Serotonin in einem Lauf nicht vollständig zu trennen vermag. Die Trennung wird durch Mehrfachentwicklung erheblich verbessert. Das beste Ergebnis wird bereits nach 4 Läufen erreicht, weil mit der Zunahme der Entwicklungen auch die Diffusion der Flecke zunimmt. Die Technik der Mehrfachentwicklung wurde aber fallengelassen, da sie sehr zeitraubend ist.

Die Sichtbarmachung der Indolderivate erfolgt mit dem DACA-Reagens. Im folgenden Abschnitt sollen die Bedingungen untersucht werden, die die quantitative densitometrische Bestimmung der Metaboliten mit diesem Reagens ermöglichen.

Bedingungen zur quantitativen densitometrischen Bestimmung

Um die Indolderivate auf der Dünnschichtplatte densitometrisch messen zu können, müssen sie mit einem Reagens sichtbar gemacht werden können. Wir verwendeten dazu das von Harley-Mason¹²⁶ zuerst erwähnte DACA-Reagens mit folgender Zusammensetzung: 2 g p-Dimethylaminozimtaldehyd werden in 100 ml 6 n Salzsäure und 100 ml Aethanol gelöst. Die Lösung kann; im Kühlschrank vor Licht geschützt, mehrere Wochen aufbewahrt werden. Die getrockneten Platten werden nur leicht besprüht, um einen hohen Untergrund zu vermeiden. Die blauen Flecken (z.B. Serotonin) treten schon während des Sprühvorganges hervor, die violetten (z.B. Tryptophan) hingegen erst nach einigen Minuten. Gleich nach dem Ansprühen werden die Chromatogramme deshalb während 2 Minuten in einem Ofen bei 60° aufbewahrt und 10 Minuten nach dem Besprühen gemessen. Abb. 4 zeigt ein angefärbtes Chromatogramm, nach Entwicklung im ketonhaltigen Laufmittel.

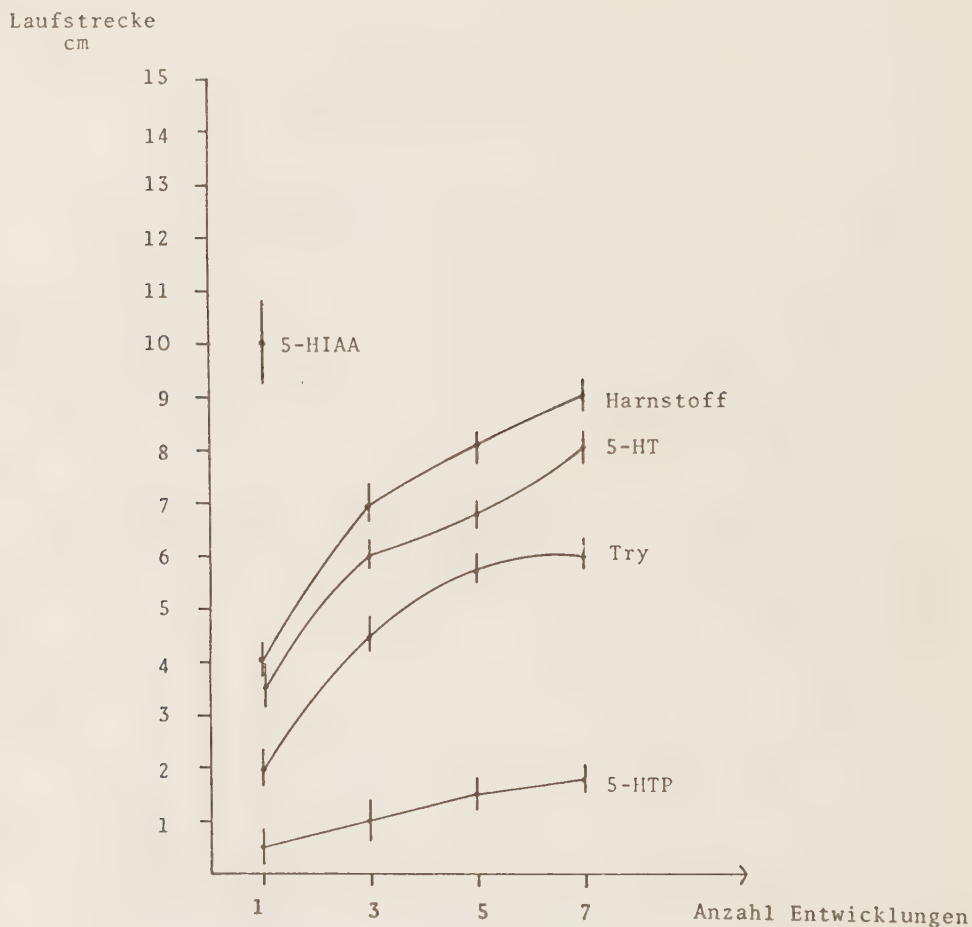


Abb. 3

Trennung einiger Indolderivate und Harnstoff durch Mehrfachentwicklung mit Isopropanol - 5n Essigsäure - Chloroform - Wasser - Methanol (50:1:50:10:5).

Laufstrecke: 1. Lauf: 15 cm Läufe 2-7; 10,5 cm.



Abb. 4. Trennung verschiedener Metaboliten von Tryptophan und Harnstoff auf mikrokristalliner Cellulose mit dem Laufmittel Butanon-(2)-Aceton-2,5 n Essigsäure (40:20:20). Die folgenden Verbindungen wurden mit dem DACA-Reagens angefärbt:

1. 5-HIAA, 2. D,L-5-HTP, 3. IAA, 4. D-5-HTP, 5. Melatonin, 6. D,L-Tryptophan, 7. Harnstoff, 8. 5-Methoxyindolessigsäure, 9. Bufotenin, 10. L-Tryptophan, 11. DMT, 12. D,L-Kynurenin. (Die Farben sind nicht korrekt wiedergegeben, da nach dem Ansprühen die Platte weiss oder leicht rosa erscheint.)

Die Flecken werden mit dem Chromatographiezusatzgerät zum Zeiss-spektralphotometer gemessen. Dieses Gerät erlaubt sowohl Transmissions- wie Reflexionsmessungen.

Abb. 5 zeigt das in Reflexion oder Transmission gemessene Spektrum von Serotonin und Tryptophan. Die Spaltbreite wurde auf 0,06-0,08 eingestellt, was einer Bandbreite von 4-5 nm entspricht. Die Spektren zeigen für das Amin ein Absorptionsmaximum bei 610 nm, für die Aminosäure bei 595 nm (unkorrigierte Werte). Bei diesen Wellenlängen wurden später die quantitativen Bestimmungen vorgenommen. Diese Maxima weisen auf eine Kondensation zwischen dem Aldehyd und der Indolverbindung an deren C-2 Atom hin. Die Buckel in den Spektren zeigen, dass teilweise auch eine Reaktion zwischen dem Aldehyd und der Aminogruppe der Seitenkette des Tryptophans oder des Serotonins stattfinden kann (siehe Diskussion).

In seiner Kurzmitteilung berichtete Harley-Mason¹²⁶ von der hohen Empfindlichkeit des Reagens im Vergleich zu p-Dimethylaminobenzaldehyd in der Papierchromatographie. Es hat sich hier leider auch gezeigt, dass beim Exponieren der Dünnschichtchromatogramme an Luft und Licht der Untergrund zunimmt. Die rötliche Färbung kann die Messung erheblich stören, wie folgender Versuch zeigt. Es stellte sich zuerst heraus, dass das Trocknen der Platten im Ofen schon nach zwei Minuten die besten Werte ergab. Es wurden sodann einige Chromatogramme mehrere Male innerhalb drei Stunden gemessen. In den Zeiten, in denen sie nicht gemessen wurden, bewahrte man sie vor Licht geschützt auf.

Die Abb. 6 gibt uns die Messwerte von vier Chromatogrammen von je weiß 35 ng Serotonin. Die erste Messung, drei Minuten nach dem Anfärben, gibt uns den Wert, der gleich 100 % gesetzt wird. Die anderen Messwerte wurden im Verhältnis zum ersten in Prozenten ausgedrückt. Es fällt gleich auf, dass die einzelnen Chromatogramme nicht miteinander verglichen werden können. Schon nach einer halben Stunde, spätestens nach 90 Min., nehmen die Werte regelmässig ab. Die günstigste Messzeit liegt zwischen 10 und 30 Minuten nach dem Besprühen der Celluloseschicht. Diese Abnahme ist nicht etwa auf

Absorption

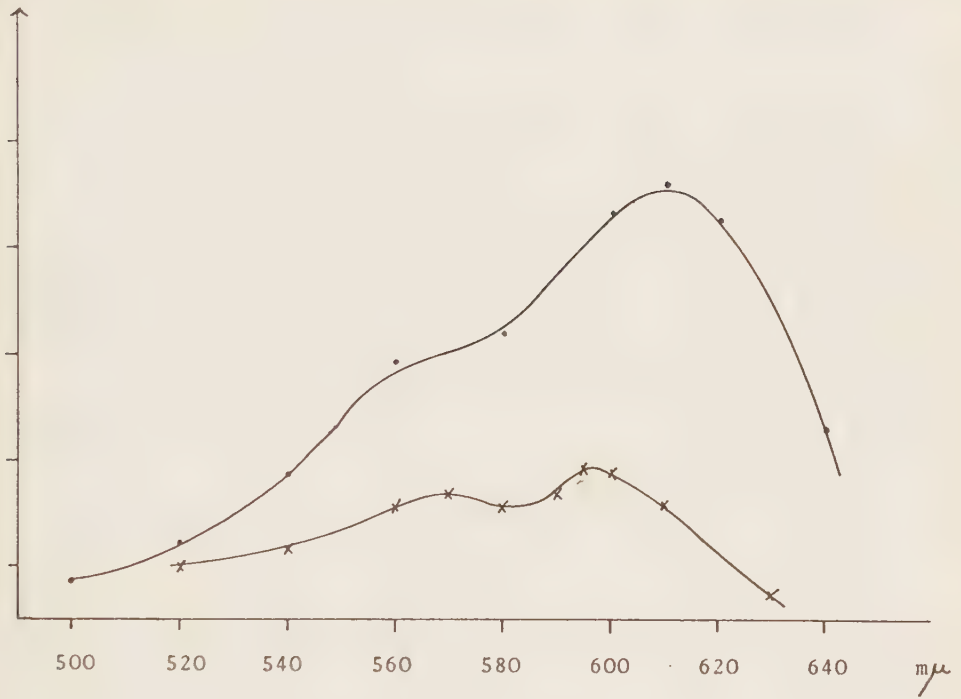


Abb. 5

Absorptionsspektren von 5-HT (·) und Try (x) nach Anfärben auf Celluloseplatten mit DACA-Reagens.

günstigste

Messzeit

3

von

Ausgangswert

110

100

90

80

3'-4'

30'

60'

90'

120'

150'

180'

Zeit

Abb. 6

Messwerte in Abhängigkeit von der Zeit nach dem

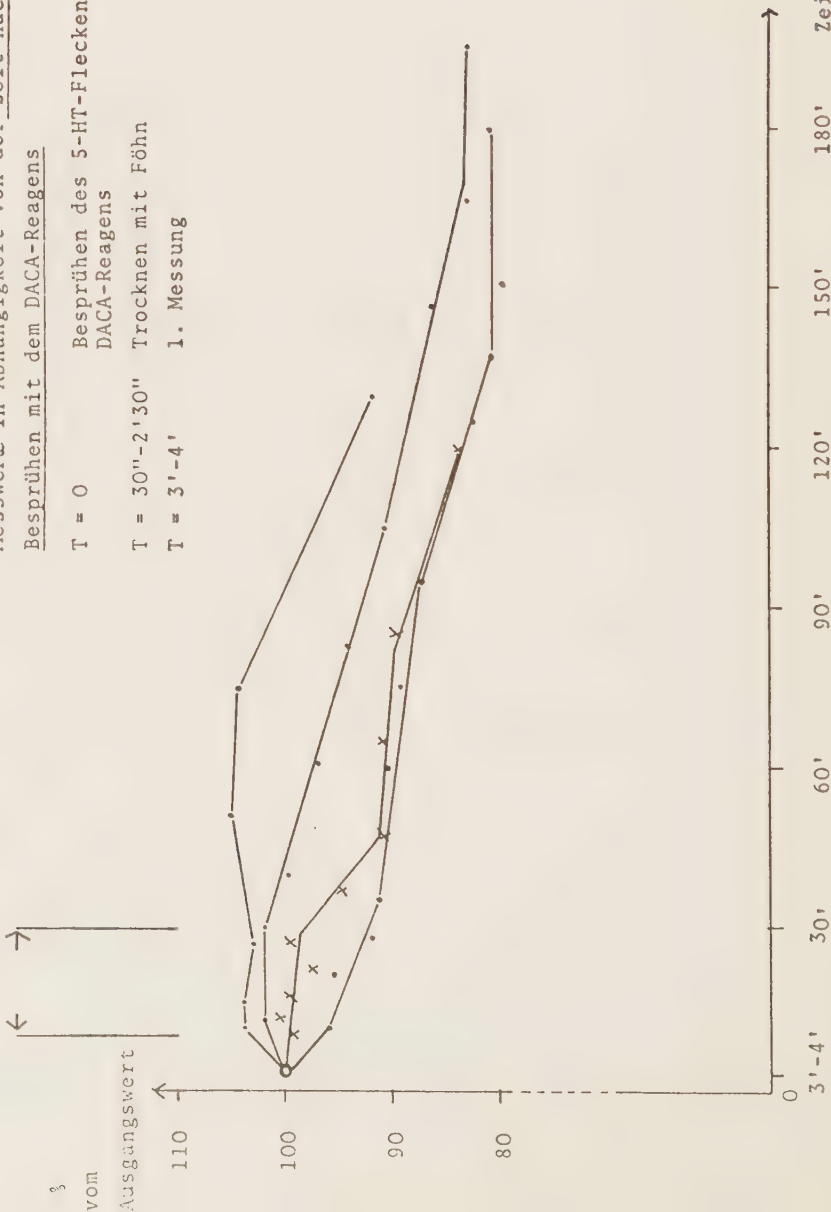
Besprühen mit dem DACA-Reagens

T = 0 Besprühen des 5-HT-Fleckens mit

DACA-Reagens

T = 30"-2'30" Trocknen mit Föhn

T = 3'-4' 1. Messung



ein Verblässen der Flecke zurückzuführen, sondern vielmehr auf eine Zunahme des Untergrundes.

Im Handbuch von Stahl ¹³⁷ gibt eine sehr ausführliche Tabelle die Sprühreagenzien für Indolderivate an. Das DACA-Reagens soll danach noch 500 ng Serotonin auf Silikagel sichtbar machen können. Die Nachprüfung ergab, dass das Reagens unter diesen Umständen gar 200 ng des Amins sichtbar anfärbte. Diese Nachweisgrenze war aber ungenügend für unsere Versuche. Es wurde deshalb die Empfindlichkeit des Reagens auf Cellulose überprüft, indem verschiedene Faktoren variiert wurden: Form der Flecken, Messung in Transmission oder Remission, Adsorbentien verschiedener Firmen, unterschiedliche Indolderivate.

Eichkurven mit Reinsubstanzen sollten den Bereich der Verwendbarkeit des Reagens für die quantitative Analyse angeben.

Abb. 7 gibt einige Beispiele von Eichkurven. Hieraus wird ersichtlich, dass die Messung in Transmission empfindlicher ist als in Remission. Bedingung ist jedoch, dass die Celluloseschicht so gleichmässig wie möglich ist. Bei Remissionsmessungen spielt dieser Faktor eine geringere Rolle. Im Beispiel wird gezeigt, dass in Transmission noch 5 ng Serotonin, jedoch nur etwa 20 ng Tryptophan gemessen werden können. Es eignet sich hierfür sowohl faserförmige wie mikrokristalline Cellulose.

Durch punktförmiges Auftragen kann die Empfindlichkeit eher noch gesteigert werden. Das Gerät erlaubt Messungen von spaltenförmigen wie auch von kreisförmigen Flecken. Mittels eines Diaphragmas kann das auffallende Licht der Fleckengrösse angepasst werden. Für quantitative Gewebsbestimmungen wurde jedoch spaltenförmig aufgetragen, da hier die Kapazität höher liegt und die Flecken gleichmässiger werden. Fertigplatten eignen sich für die Auftrennung von Reinsubstanzen. Sie sind jedoch sehr dünn beschichtet, was sie für Gewebsanalysen wegen Überladungseffekten nicht sehr geeignet macht.

mg Papier

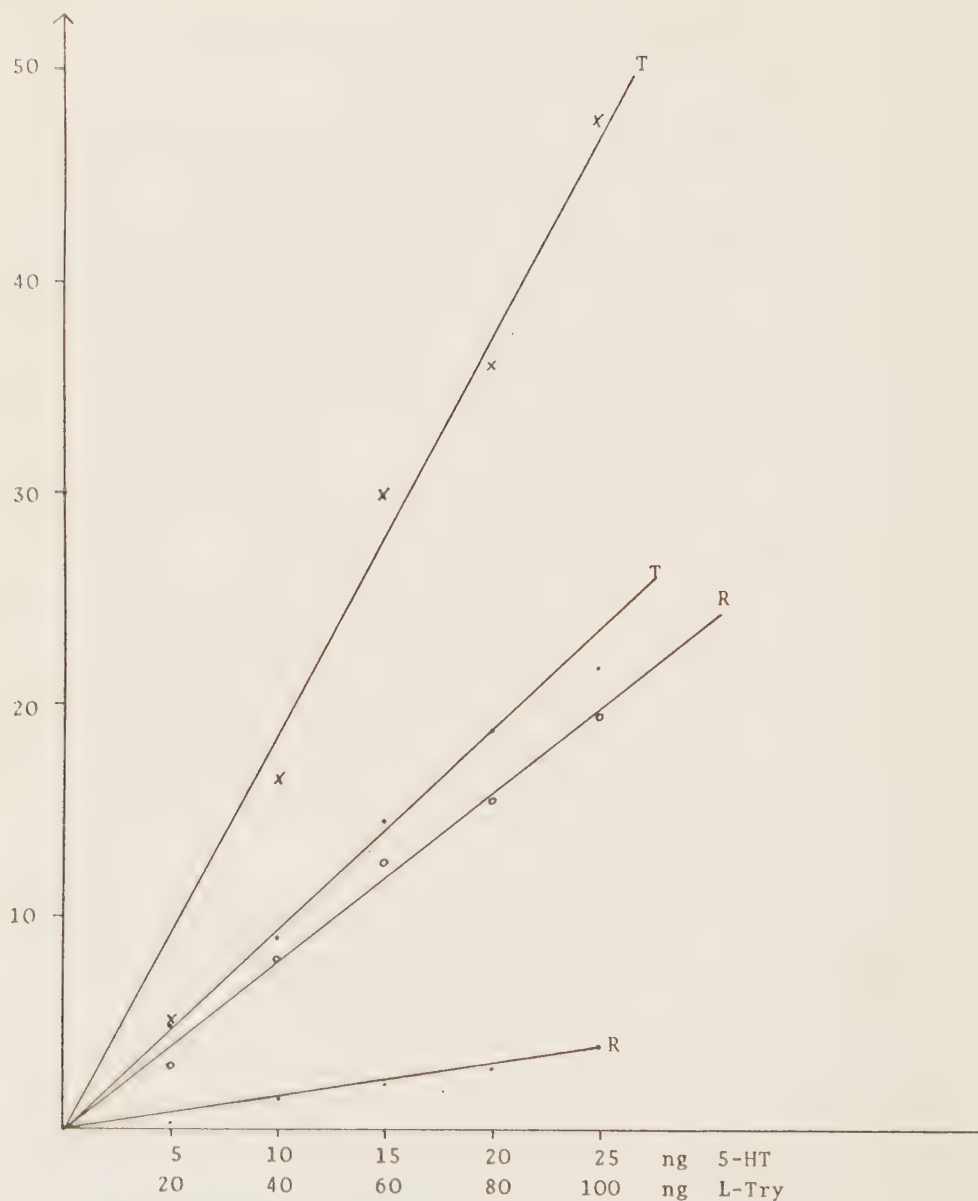


Abb. 7

Eichkurven von 5-HT (•) und L-Try (x,o) auf einer Avicel-Cellulose-Platte in Remission (R) und Transmission (T) gemessen. Fleckenbreite 14 mm.

Polyamidplatten werden vom DACA-Reagens grün gefärbt, was seine Anwendbarkeit auf diesen Platten nicht zulässt.

Die Abb. 8 zeigt in Remission gemessene Kurven von punktförmigen Flecken, von Serotonin und Bufotenin. Jeder Punkt stellt eine Anzahl von Flecken gleicher Menge auf einer Platte dar. Daraus kann gelesen werden, dass im Prinzip auch verschiedene Platten direkt miteinander verglichen werden können. Eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von Platte zu Platte kann jedoch nicht garantiert werden, weshalb auf direkte Vergleiche bei Gewebsanalysen verzichtet wird.

Bei Transmissionsmessungen haben wir keinen TE-Wandler verwendet. Beim Registrieren der Kurve musste deshalb die Basislinie genau eingehalten werden. Abb. 9 zeigt die Abnahme der registrierten Fläche eines gemessenen Serotoninfleckens bei Verschieben der Nulllinie.

Bei quantitativen densitometrischen Bestimmungen von Gewebsextrakten werden die Werte an Hand einer Eichkurve ermittelt. Ideal ist in dieser Hinsicht eine Eichgerade, da sie zu ihrer Festlegung nur zwei Punkte benötigt. Wie andere Autoren zeigten, gibt es in einem grösseren Bereich keine direkte lineare Beziehung zwischen der aufgetragenen Substanzmenge und der registrierten Fläche. So wird z.B. vorgeschlagen, die registrierte Fläche gegen die Quadratwurzel der Konzentration des Messfleckens aufzutragen ¹³⁸.

In verschiedenen Versuchen haben wir den Bereich der Linearität zwischen "Peakgewicht" und aufgetragenen Substanzmenge überprüft. Abb. 10 zeigt uns ein Beispiel, in dem die lineare Beziehung für Serotonin im Bereich von 0-50 ng gegeben ist. Die Kurve zeigt aber oberhalb 50 ng eine deutliche Abflachung. Der aufgetragenen Substanz wurde aber vorher radioaktives Serotonin zugegeben. Nach der densitometrischen Messung wurden die Flecken ausgekratzt und die Radioaktivität gemessen. Die Abbildung zeigt, dass hier die Eichkurve auch bis 120 ng Serotonin noch linear ist. Es lässt sich daraus schliessen, dass die Cellulose auch durch 120 ng Serotonin nicht überladen wird. Es müssen andere Faktoren für

Abb. 8

Peakfläche

mm²

oder

0,1 mg

Papier

Remissionskurven von punktförmigen Flecken von Bufotenin (·) gemessen bei 600 m μ , und Serotonin (o) gemessen bei 550 m μ . Für jeden Wert wurde eine andere Celluloseplatte verwendet. () = Anzahl Eichpunkte pro Platte. Für Bufotenin wurden die Werte als Funktion der Peakfläche angegeben.

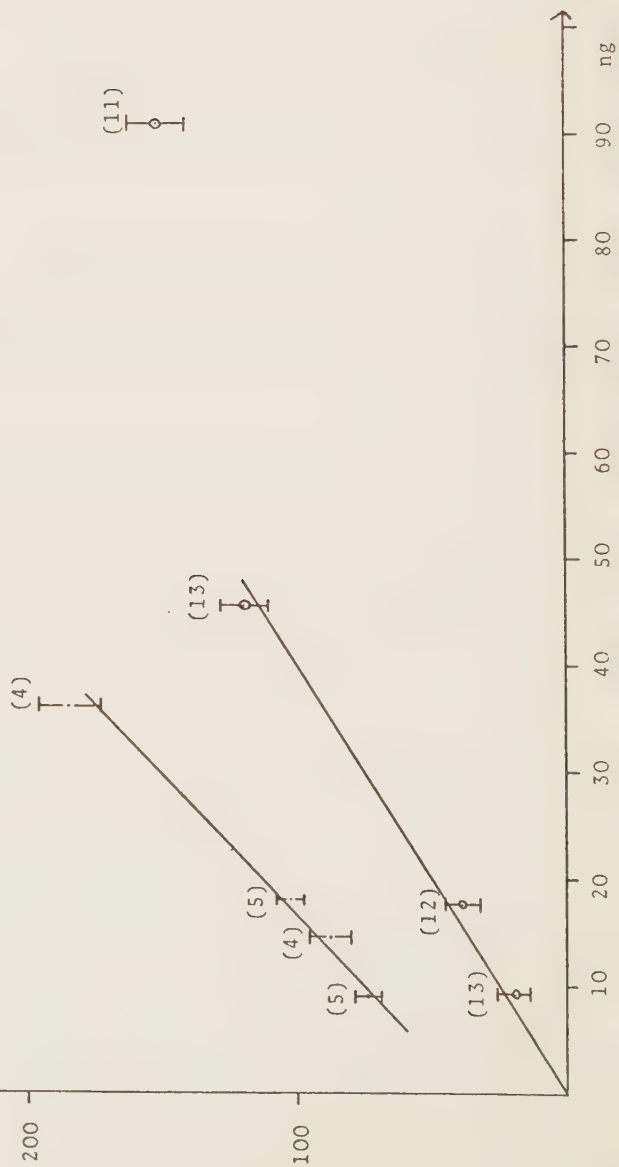


Abb. 9

Abhängigkeit der gemessenen Absorption von der Basislinie. Es wurde die Veränderung der gemessenen Absorption eines Serotonin-fleckens bei Verschiebung der Nulllinie von Transmission = 100 % in Richtung Transmission = 0 % aufgezeichnet.

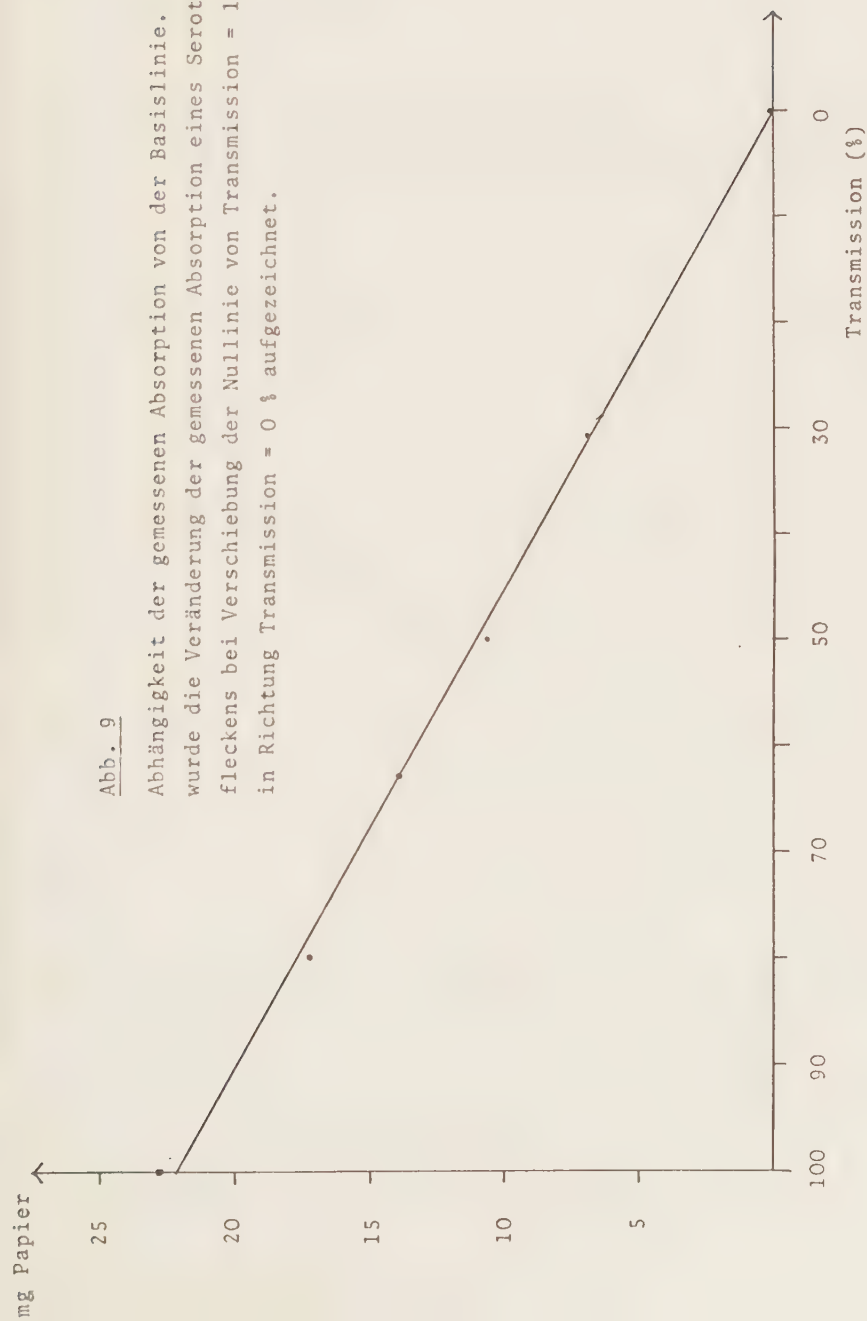
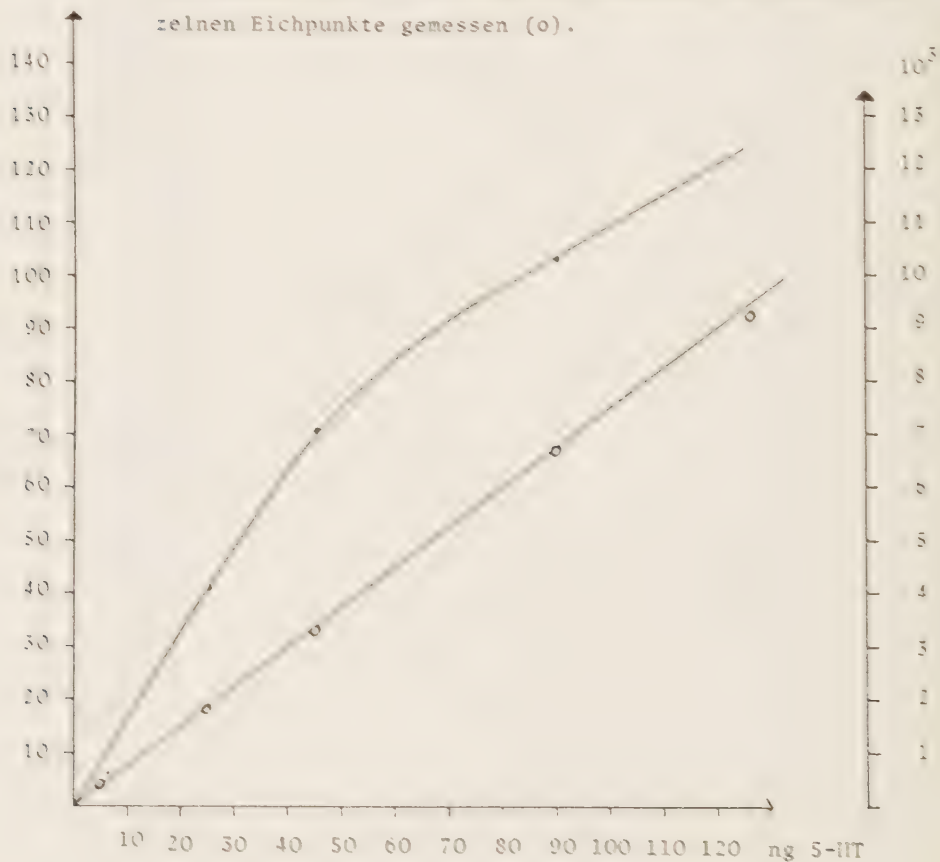


Abb. 10

mg Papier

Fickkurven von 5-HT- C^{14} . Es wurde sowohl die Absorption in Transmission (.) wie auch die Radioaktivität der einzelnen Eichpunkte gemessen (o).



die Abflachung der densitometrischen Eichkurve verantwortlich sein, wie Form der Flecken, Adsorption des Amins an der Cellulose, Unregelmässigkeiten bei der Anfärbung.

Bei Gewebebestimmungen wurden deshalb Eichpunkte, die möglichst nahe dem zu erwartenden Wert liegen, gewählt, obwohl in diesem Beispiel (Abb. 10) eine lineare Beziehung zwischen der Wurzel des "Peargewichtes" und dem Logarithmus der Konzentration gefunden wurde.

In einem weiteren Versuch haben wir, im Hinblick auf Untersuchungen im Gewebe, Eichkurven von den drei uns am meisten interessierenden Substanzen, nämlich D, L-5-HTP, L-Tryptophan und Serotonin in dem uns interessierenden Bereich an Hand einer Dünnschichtplatte aufgestellt.

Abb. 11 gibt die Werte der auf der Abb. 12 gezeigten Flecken wieder. Auffallend ist die gute Trennung der optischen Isomere von 5-HTP. In der Eichkurve ist in diesem Fall die Summe der beiden Peaks eingezeichnet. Die Kurve ist hier keine Gerade, da sich die Fleckengrösse mit zunehmenden Mengen verändert.

Abschliessend wurde noch der Einfluss der Spaltlänge des einfallenden Lichtes und die Länge des zu messenden Fleckens auf die Grösse des Messwertes untersucht. Aufgetragen wurden jeweils 25 ng Serotonin, je drei Mal bei einer Auftragsbreite von 7 mm ("punktförmig") und von 15 mm. Abb. 13. Gemessen wurde mit verschiedenen Spaltlängen. Wie zu erwarten, wurden die höchsten Werte bei einer Auftragsbreite von 7 mm und einer Spaltlänge von 6 mm erhalten. Bei einer grösseren Spaltlänge ist der Lichtspalt grösser als der zu messende Fleck - die Werte nehmen ab. Obwohl die Ausbeute bei einer Fleckenbreite von 15 mm geringer ist, wurde diese Grösse gewählt, um mehr Gewebeertrakt auftragen zu können. Ausserdem ist der Fleck unter diesen Bedingungen gleichmässiger. Um Randeffekte auszuschalten, wurden die Flecken bei Gewebeanalysen bei einer Spaltlänge von 10 mm gemessen. Wurden Gewebeertrakte auf eine Breite von 16 mm aufgetragen, so schrump-

Abb. 11

Eichkurven zu Abb. 12. Auftrennung von
D,L-5-HTP, L-Try und 5-HT mit dem
Laufmittel.

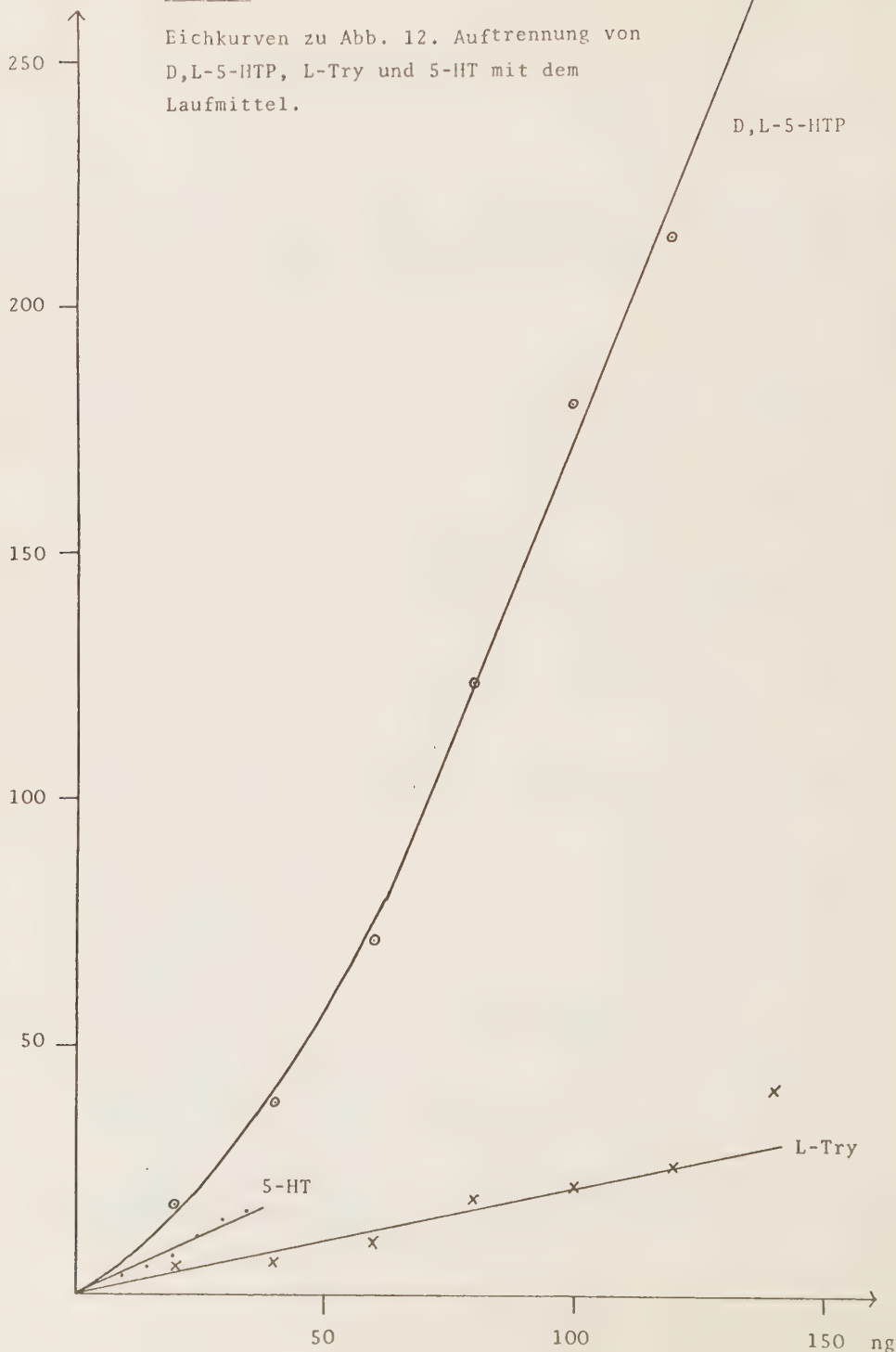




Abb. 12: Chromatogramm von D,L-5-HTP, L-Try und 5-HT auf mikro-
 kristalliner Cellulose. Entwicklung in Laufmittel: Butanon-(2),
 Aceton-2,5 n Essigsäure (40:20:20). Die Substanzen wurden in
 steigenden Mengen aufgetragen. Die ermittelten Lichtkurven der
 Messung in Transmission sind in Abb. 11 wiedergegeben.

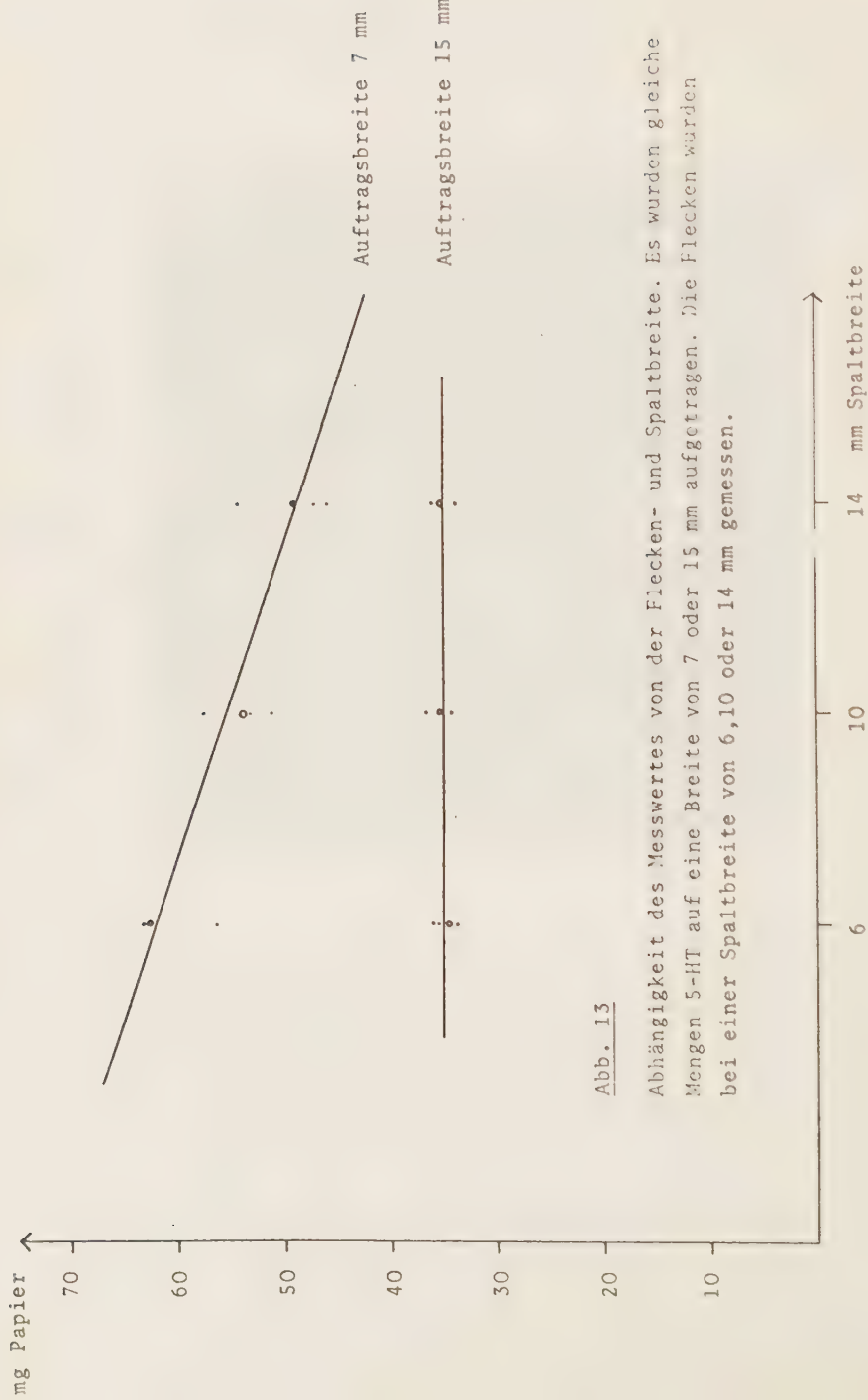


Abb. 13

Abhängigkeit des Messwertes von der Flecken- und Spaltbreite. Es wurden gleiche Mengen 5-HT auf eine Breite von 7 oder 15 mm aufgetragen. Die Flecken wurden bei einer Spaltbreite von 6,10 oder 14 mm gemessen.

ften die Flecken nach der Entwicklung im Laufmittel auf eine Breite von etwa 14 mm zusammen. Aus diesem Grunde werden in den Tierversuchen Gewebextrakte auf eine Breite von 26 mm, Eichflecken auf 14 mm aufgetragen. Die Messung erfolgt bei einer Spaltlänge von 10 mm.

Bestimmung der Ausbeute

Es wird die Ausbeute für den Aufarbeitungsschritt "Chromatographie" bestimmt. Das Kleinhirn von Ratten enthält kein Serotonin in messbaren Mengen. Dieses Gewebe wurde nach der beschriebenen Methode aufgearbeitet. Aufgetragen wurden zwei bis drei Portionen von 50 μ l Kleinhirnextrakt mit der berechneten Menge von 25 ng Serotonin auf eine Breite von 26 mm. Dementsprechend wurden auf eine Breite von 14 mm zwei bis drei Aliquots à 50 μ l eines Gemisches von Methanol/Wasser, enthaltend 25 ng Serotonin, appliziert.

Die Tabelle 2 gibt die Werte einzeln aufgeführt. Die Ausbeute beträgt $94,9 \pm 2,1$ %. Dieser Wert deckt sich mit dem, der mit radioaktiv markiertem Serotonin erhalten wurde.

Für Tryptophan wurde deshalb keine Ausbeute berechnet. Es wird der Wert von 91,5 % angenommen, der für radioaktives 5-HTP erhalten wurde. Für die übrige Aufarbeitung gilt die gleiche Methode, die zur Identifizierung der radioaktiven Metabolite ausgearbeitet wurde. Die Ausbeute der Methode beträgt demnach 69 % für das Serotonin und 92 % für das Tryptophan, wie in einem späteren Kapitel gezeigt wird. (Tab. 6)

Die in diesem Kapitel erhaltenen Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Das DACA-Reagens erlaubt den qualitativen Nachweis von 5 ng Serotonin und 10 ng Tryptophan. Diese Mengen können densitometrisch bereits gemessen werden, doch empfiehlt es sich, nicht geringere Mengen als 10 ng Serotonin und 20 ng Tryptophan quanti-

Kleinhirn	Chromatogramm	Messwerte		Mittelwerte		Ausbeute %	
		Extrakt	Eichpunkte	Extrakt	Eichpunkte	Mittelwert	Mittelwert
1	1	22,6;21,8;21,6	24,2;24,2;23,5	22,0	24,0	91,8	
	2	19,4;22,7	24,8;21,0	21,1	22,9	92,2	
	3	16,8;17,0;16,4	17,4;18,3	16,7	17,9	93,4	92,5
2	4	16,6;20;16,9	19,4;18,7	17,8	19,1	93,5	
	5	10,2;13;10,8	12,2;10,8	11,3	11,5	98,5	96,0
3	6	24;27,2;23,5	25,2;26,0	23,9	25,6	93,5	
	7	24,5;21,9;22,2	22,0;24,5	22,9	23,3	98,9	96,2
Ausbeute:						94,9 ± 2,1 %	=====

Tab. 2

Ausbeute nach der Chromatographie von zu Kleinhirnextrakt gegebenem Serotonin.

tativ zu bestimmen. Die Empfindlichkeit ist abhängig von der Wahl der Trennschicht, des Laufmittels, der Form der Messflecken, der Form des Lichtspaltes, der Wellenlänge. Bei gleichmässiger Trennschicht wird die Messung in Transmission empfohlen. Die Eich- und Testflecken sollen auf dem gleichen Chromatogramm liegen. Die Menge der Eichsubstanz soll etwa der des Testfleckens entsprechen, da die Linearität der Eichkurven über einen grösseren Bereich nicht gegeben ist.

V. ANWENDUNGEN: DENSITOMETRISCHE BESTIMMUNGEN VON 5-HT UND TRYPTOPHAN IM RATTENHIRN

Zur densitometrischen Bestimmung von Serotonin im Stammhirn der Ratte wurden drei Stammhirne vom Gewicht 0,43 - 0,46 g mit Methanol homogenisiert. Von den gepoolten Extrakten wurden 8 Doppelbestimmungen ausgeführt. Pro Dünnschichtplatte wurden 15,20 und 25 ng des 5-HT-Standards und zweimal je 75 μ l des Extraktes aufgetragen. Die Abb. 14 zeigt die gemittelte Eichkurve aus allen acht Eichkurven, sowie den Mittelwert der acht Doppelbestimmungen. Das rechnerische wie graphische Verfahren liefert den Wert $28,4 \pm 3,8$ ng (13 %) pro 75 μ l Extrakt. Zur Ermittlung der Eichgerade wurde die Regressionsgerade durch die Eichpunkte berechnet. Bei Berücksichtigung der Ausbeute (= 70 %) wird der Serotoningehalt von 1340 ng ± 175 ng/g Stammhirn erhalten.

Zur Bestimmung von Tryptophan im Stammhirn wurde in gleicher Weise vorgegangen. Diese Aminosäure liegt jedoch im Hirn in grösseren Mengen vor, weshalb zur Festlegung der Eichkurve jeweils 60, 100 und 140 ng Tryptophan genommen wurde. Es wurden 6 Doppelbestimmungen bei 4 gepoolten Stammhirnen ausgeführt. Die Tabelle 3 gibt die einzelnen Werte der Eichkurven sowie die Mittelwerte aus der Doppelbestimmung an. Bei Berücksichtigung der Ausbeute (= 90 %) wird ein Gehalt von $5,35\gamma \pm 0,33$ (6,1 %)/g Stammhirngewebe gefunden.

Auffallend ist, dass die Eichkurven von Platte zu Platte variieren, die Testwerte aber im gleichen Masse. Es ist deshalb ausgeschlossen, Eichflecken und Testflecken verschiedener Platten miteinander zu vergleichen.

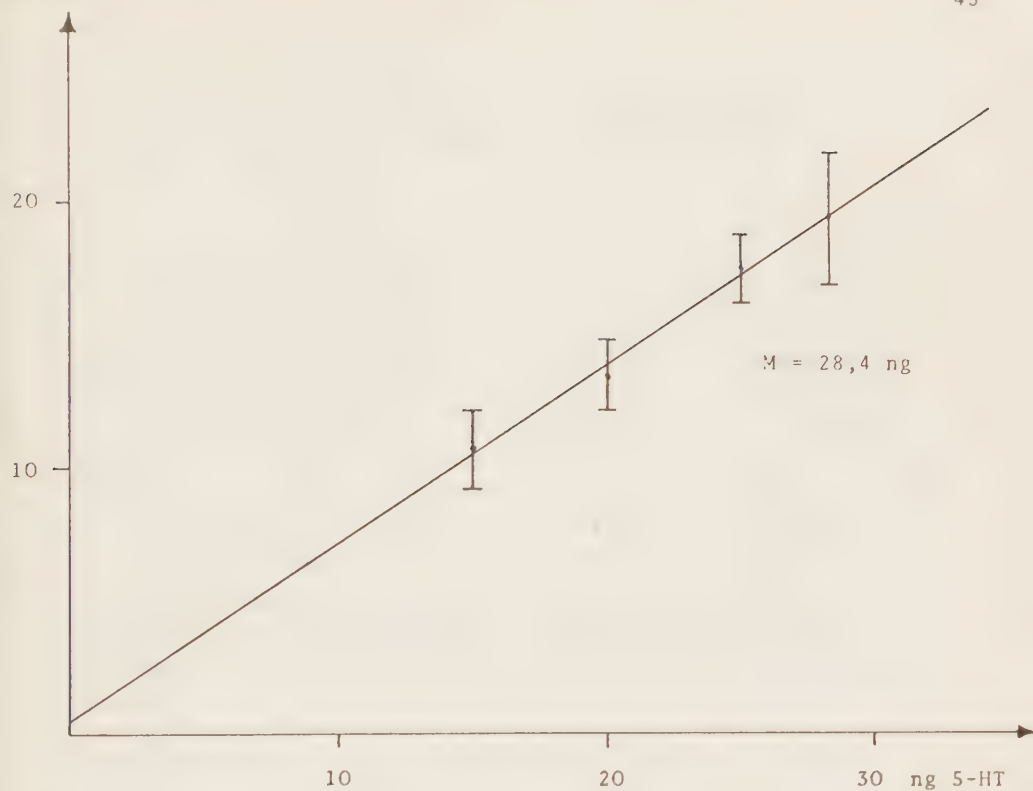


Abb. 14

Bestimmung von 5-HT in drei gepoolten Stammhirnen von Ratten. Die Eichkurve und der Testwert stellen die Mittelwerte von 8 Doppelbestimmungen dar. Die Eichkurve setzt sich aus den Werten 15, 20 und 25 ng 5-HT zusammen.

Chromatogramm	Messwerte der Eichkurve				Mittelwert von 2x 50 μ l Hirneztrakt	Ermittelte Werte in ng
	60 ng	100 ng	140 ng	59,4		
1	8,7	26,2	59,4		25	90
2	11,5	13,4*	27,8		16,2	86
3	17,4	25,2	33,0		21,8	82
4	24,1	49,0	68,4		37,2	80
5	18,2	41,3	72,9		28,8	77
6	16,9	-	62,6		26,4	78

$$* 80 \text{ ng} \quad \text{Mittelwert:} \quad \frac{82 \pm 5 \text{ ng/50 } \mu\text{l}}{\text{Extrakt}}$$

Tab. 3

Bestimmung von Tryptophan in 4 gepoolten Stammhirnen.

VI. ENTWICKLUNG EINER METHODE ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON RADIOAKTIV MARKIERTEN INDOLDERIVATEN IM RATTENHIRN

Die direkte Vorstufe zum Serotonin bildet das 5-HTP, das unter normalen Bedingungen im Organismus jedoch nicht in nachweisbaren Mengen auftritt. Das 5-HTP selber entsteht aus Tryptophan. Diese Verbindung weist jedoch mehrere Abbauewege auf, wobei rein quantitativ der "Serotoninweg" einer der unbedeutendsten ist. Das Studium der radioaktiv markierten Metaboliten des Tryptophans ist deshalb mit grossen Schwierigkeiten verbunden. Der Hauptteil von 5-HTP wird von der Decarboxylase zu Serotonin abgebaut, weshalb es sich zum Studium dieses Amins besser eignet. Die Schritte zur Ausarbeitung der Methode, die die Bestimmung von radioaktiv markiertem 5-HTP, 5-HT und 5-HIAA im Rattenhirn ermöglichen soll, erlauben auch die Berechnung der Ausbeute der densitometrischen Methode.

Es folgt eine kurze Beschreibung eines Tierversuches, bevor die Entwicklung der Methode näher erläutert wird:

Unbehandelte oder mit Drogen vorbehandelte Ratten erhalten eine intracisternale Injektion von radioaktiv markiertem D, L-5-HTP, in manchen Fällen von markiertem Serotonin. Nach einer bestimmten Zeit werden die Tiere getötet, die Hirne präpariert, homogenisiert. Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie werden die Metaboliten aufgetrennt und im Szintillationszähler quantitativ bestimmt.

Die Methode sollte, um eine hohe Ausbeute zu erlauben, möglichst wenige Schritte umfassen. Zur Bedingung stand aber die quantitative Trennung der drei Metaboliten.

Es wurde deshalb zunächst das geeignetste Lösungsmittel zum Homogenisieren gesucht:

Je 10 μ l (1 μ Ci) einer D,L-5-HTP-C¹⁴-Lösung wurden zwei Tieren intracisternal injiziert, die 2h 10' danach dekapitiert wurden. Durch einen Sagittalschnitt wurden die Hirne in zwei Hälften geteilt, mit doppeltem Volumen Lösungsmittel homogenisiert. Das Homogenat wurde eine halbe Stunde bei 32000 g zentrifugiert. Vom ersten Auszug wurde gleich ein Aliquot im Szintillationszähler gemessen, ein zweites zur Bestimmung der Metaboliten chromatographiert. Der Rückstand wurde im doppelten Volumen Lösungsmittel aufgeschwemmt und nochmals zentrifugiert. Ein Aliquot dieses 2. Auszuges wird ebenfalls gemessen. Zum Niederschlag wurden nunmehr nur noch 0,5 ml Lösungsmittel gegeben. Wieder wurde ein Teil des aufgeschwemmten Gewebes gemessen.

Die Tabelle 4 gibt uns die Werte nach dem Homogenisieren mit Methanol, 0,1 n Salzsäure oder 0,4 n Perchlorsäure in Impulse pro Minute (IPM). (Die Löschung wurde nicht mitberücksichtigt.) Die IPM aller drei Extrakte werden gleich 100 % gesetzt. Die Prozentangaben beziehen sich auf die IPM aller Extrakte im oberen Teil, auf die IPM des 1. Auszuges im unteren Teil der Tabelle.

Es zeigt sich, dass Methanol die höchste Ausbeute im ersten Auszug ergab. Auch die Löschung war mit diesem Lösungsmittel am geringsten. Die Chromatographie erlaubte bei Verwendung des Alkohols eine ausgezeichnete Trennung, die mit den anorganischen Säuren nicht gelang, weshalb die angenäherten Werte in Klammern gesetzt wurden. In manchen Fällen ist es von Vorteil, das Auftragegerät von Waessle und Sandhoff zum Applizieren des Extraktes zu verwenden. Dies ist aber mit sauren Lösungsmitteln nicht möglich, da sie die Messingteile der Auftragspritze beschädigen und Schwermetallionen mit aufgetragen werden. In den folgenden Tierversuchen wurde das Gewebe deshalb mit der 1½ - 2-fachen Menge Methanol (Methanol:Volumen, Gewebe:Gewicht) zerkleinert. Dies entspricht einer Wasser-Alkohol-Extraktion im approximativen Verhältnis von 0,7:1,5-2,0.

Zur Dünnschichtchromatographie auf Cellulose wurde das von Giese für Noradrenalin-Metaboliten verwendete Laufmittel n-Butanol-

Hirn 1

Hirn 2

Methanol		0,1 n HCl		0,4 n HClO ₄		Methanol	
IPM	%	IPM	%	IPM	%	IPM	%
57 200	77,2	55 000	67,6	39 820	73,9	94 820	80,5
12 350	16,7	19 950	24,5	8 265	15,3	16 910	14,4
4 550	6,1	6 450	7,9	5 825	10,8	6 000	5,1

5 n Essigsäure (100:35) als geeignet gefunden, da es die Metaboliten 5-HTP, Serotonin und 5-HIAA ausgezeichnet trennt (hRf-Werte s. Tabelle 1). Um starke Lösungen zu vermeiden, wurden im Tierversuch meistens die Eichsubstanzen (je etwa 100 ng) nicht auf die gleiche Bahn wie das Extrakt aufgetragen. Es wurden dann nach der Entwicklung nur die Eichsubstanzen mit dem DACA-Reagens besprüht. So brauchte nur die Cellulose der Bahn mit Gewebeeextrakt auf der gleichen Höhe wie der nicht markierte Metabolit (Eichsubstanz) ausgekratzt zu werden.

Zur Erreichung der höchsten Ausbeute musste die geeignete Szintillatormischung sowie die beste Einstellung des Szintillationszählers der Firma Packard gewählt werden.

Das Szintillatorgemisch wurde ebenfalls von Giese übernommen. Die Grundlösung besteht aus PPO, POPOP in Toluol. Zur Messung von alkoholischen Extrakten wurden zu 15 ml dieser Lösung 4 ml Methanol beigelegt. Die Cellulose hingegen wurde in einem Gemisch der Grundlösung mit thixotropem Gel-Pulver suspendiert.

Methanol selber ist ein mittelstarker "Löcher", weswegen sein Einfluss auf die Zählrate ermittelt werden musste. Es wurden deshalb 100 μ l einer wässrigen Lösung von C^{14} -5-HTP in 15 ml der Grundlösung gebracht und gezählt. Die Abb. 15 gibt uns die Zählrate der Probe nach Zugabe von Methanol an, bei einer Zählfensterbreite von 50-1000 und bei einer Verstärkung von 15 oder 25 %. Bei niedrigem Alkoholgehalt ist die Lösung der Aminosäure im Toluol unvollkommen, somit die Zählrate niedrig. Um eine gute Ausbeute zu erhalten, muss mindestens 1 ml Methanol zugegeben werden. Die Ausbeute sinkt aber bei der Verstärkung von 15 % wegen der Löschung durch Alkohol wieder ab. Bei einer Verstärkung von 25 % liegt hingegen zunächst der Gipfel der Zählrate oberhalb der Grenze 1000. Durch Zugabe von Methanol wird durch das Löschen der Gipfel in das Fenster gerückt. Die Toleranz gegenüber wechselnden Mengen von Alkohol und anderen Löschern ist bei dieser Verstärkung von 25 % grösser, so dass sie bei Messungen von Extrakten eingestellt wurde. Gewöhnlich wurden 4 ml Methanol

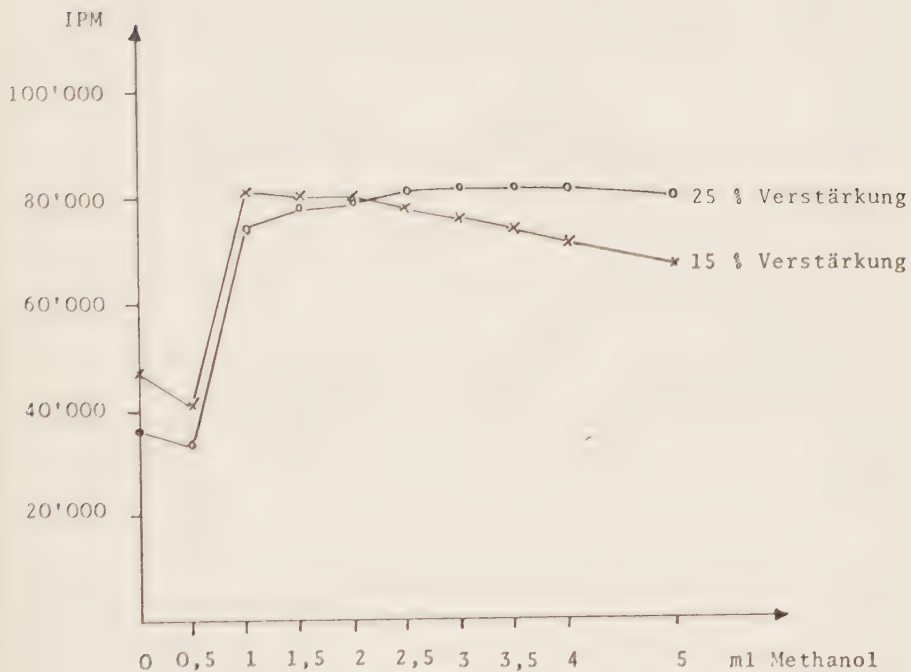


Abb. 15

Einfluss von Methanol auf die Zählrate einer wässrigen
5-HTP-C¹⁴ Lösung in PPO/POPOP/Toluol.

hinzugegeben. Die Ausbeute liegt um 82 %. Aus der Gesamtradioaktivität im Extrakt soll nur ersichtlich werden, ob die Injektion der radioaktiven Substanz erfolgreich war.

In diesem Zusammenhang war deshalb die Aufstellung der Löschkurve zur Messung von Cellulose-Suspensionen in thixotropem Gel noch wichtiger. Die Abb. 16 gibt die nach der Kanal-Verhältnis-Methode erhaltene Löschkurve unter folgenden Bedingungen:

Zu jedem mit thixotropem Gel gefüllten Zählröhrchen wurden $10\mu\text{l}$ Toluol- C^{14} ($4,45 \cdot 10^3$ DPM) sowie ungefärbte, wie mit p-DACA-Reagens gefärbte Cellulose (bis 32 cm^2) gegeben. Als günstigste Geräte-Einstellung erwies sich die Verstärkung auf 15 %, die Breite des Messkanals von 50 - 1000, die des Kontrollkanals von 90 - 1000. Die Ausbeute variierte zwischen 40 und 82 %. An Hand dieser Kurve konnte die wahre Zerfallsrate berechnet werden.

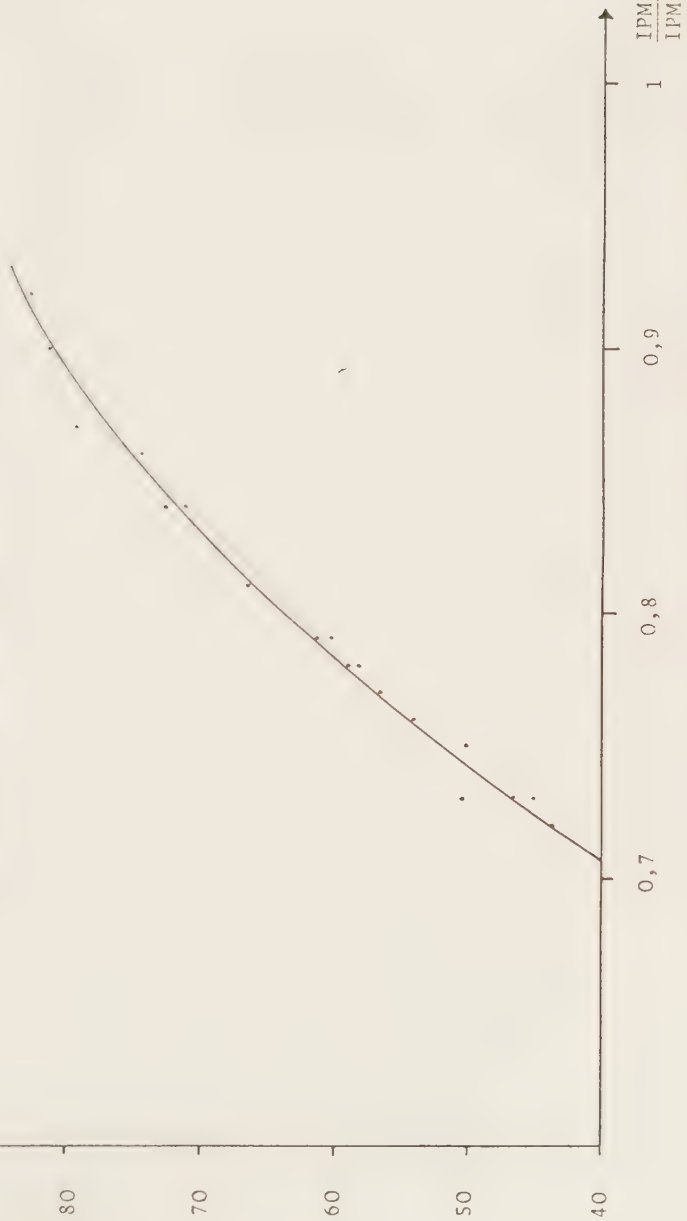
Somit konnten nun in einigen Versuchen die Verluste, die durch die Chromatographie und das Homogenisieren entstehen, berechnet werden. Verluste können durch Absorptionseffekte, Zerstörung der Indolverbindungen durch Licht und durch unvollständige Extraktion auftreten. Sodann wurde die Verteilung der drei Metaboliten während der Chromatographie geprüft.

Einige Mikroliter der Verbindungen 5-HTP- C^{14} , 5-HT- C^{14} und 5-HIAA- C^{14} wurden je einem methanolischen Hirngewebeextrakt beigefügt und einzeln chromatographiert. Die Abb. 17 zeigt die drei übereinandergelegten Spektren, die mit dem Scanner der Firma Berthold gemessen wurden. In einem analogen Versuch wurde die Schicht der Platten zentimeterweise ausgekratzt und die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen (Abb. 17).

Die Tabelle 5 gibt die R_f -Werte wieder. In der Kolonne a) wird das Teilstück in cm angegeben, welches zur Bestimmung des jeweiligen Metaboliten verwendet wird, bei einer Laufstrecke von 14,5 cm. Die Kolonne b) zeigt die Ausbeute in %, die auf diese Weise erhalten wird. Die R_f -Werte können schwanken. Man verlässt

Abb. 18

Löschkurve ermittelt mit 10 μ l Toluol- C^{14} in
PPO/POPOP/Toluol/Thixotropem Gel durch Zugabe
von gefärbter und reiner Cellulose.



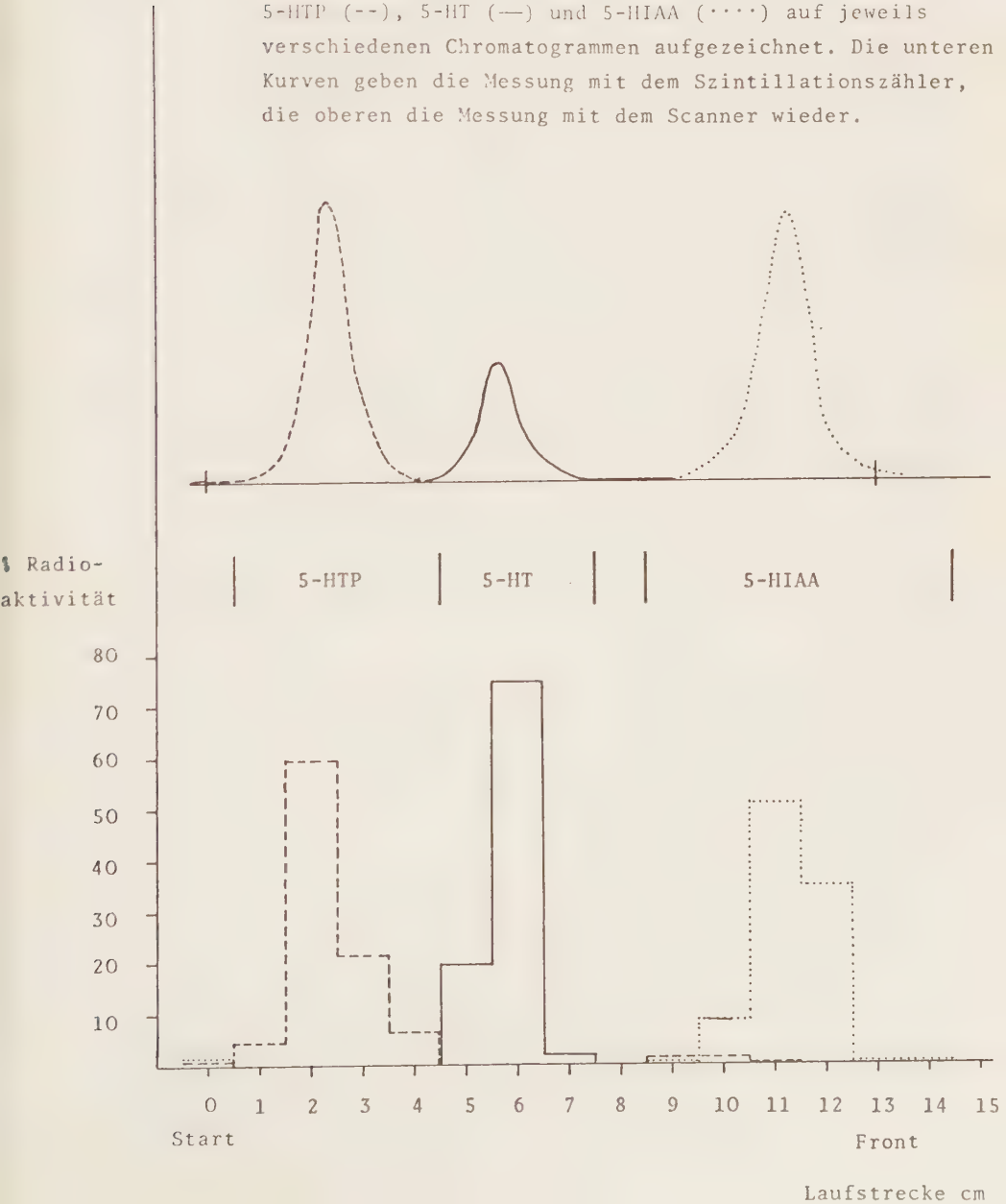
C-14 Verbindung	hRf	a	b
5-HTP	15	0,5-4,5	90,5
5-HT	40	4,5-7,5	96,6
5-HIAA	80	9,5-14,5	96,4

Tab. 5

Trennung von 5-HTP, 5-HT, 5-HIAA auf faserförmiger Cellulose mit dem Laufmittel A (s. Text).

Abb. 17

Es wird die Verteilung der C^{14} -markierten Reinsubstanzen 5-HTP (---), 5-HT (—) und 5-HIAA (····) auf jeweils verschiedenen Chromatogrammen aufgezeichnet. Die unteren Kurven geben die Messung mit dem Szintillationszähler, die oberen die Messung mit dem Scanner wieder.



sich deshalb hauptsächlich auf den Rf-Wert der angefärbten Eichsubstanz. Leider ist die Lokalisierung der Flecken mit dem relativ unempfindlichen Scanner im Tierversuch nicht möglich.

Nachdem nun die klare Trennung der Metaboliten auf der Dünnschichtplatte nachgewiesen wurde, konnte die Bestimmung der Ausbeute für die ganze Methode in einigen Experimenten bestimmt werden. Für jede der drei Verbindungen wurde die Ausbeute eigens ermittelt, indem je vier Rattenhirne mit dem doppelten Volumen Methanol (im Vergleich zum Gewicht des Gewebes) und einigen Mikrolitern der jeweiligen markierten Verbindung homogenisiert wurden. Von jedem Extrakt wurden je zwei 100 µl Proben gemessen. Dies gibt das Mass für die Ausbeute nach dem Homogenisieren.

Des weiteren wurden von drei Extrakten jeweils ein, vom 4. Extrakt drei Chromatogramme angefertigt. Die angefärbte Zone wurde ausgekratzt und gezählt. Das Ergebnis erlaubt die Berechnung der Gesamtausbeute sowie die Verluste durch die Chromatographie (Tabelle 6).

Die Berechnung wurde nach der Annahme durchgeführt, dass der hinzugefügte Tracer sich gleichmässig zwischen flüssiger und fester Phase verteilt. Für die feste Phase wurde die Dichte angenommen.

Als Rechnungsgrundlage gilt somit:

$$3 \text{ a ml} = \text{Totalvolumen} = 2 \text{ a ml Lösungsmittel} + \text{a ml Hirn}$$

$$\text{Gesamtausbeute in \%} = \frac{3 \text{ a} \cdot \text{c} \cdot 100}{0,2 \cdot \text{b}}$$

a = Hirngewicht in g (= ml)

b = eingesetzte DPM

c = DPM pro Dünnschichtchromatogramm

Zur Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung wurde dem Mittelwert der drei Bestimmungen des 4. Extraktes gleichviel Gewicht verliehen wie den drei anderen. Wir haben den mittleren Fehler der Einzelmessung nach der Formel ermittelt:

$$F = \sqrt{\frac{(X - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Derivat -C ¹⁴	Eingesetzte DPM	DPM/Gesamtvolumen nach Homogeni- sieren	DC	Ausbeute in % nach Homogenisieren	DC	Ausbeute in % für Gesamtprozess
SHIAA	2'231'000	2'319'000	1'765'000	104 ± 3	76,5	79,1 ± 2,8
SHTP	1'757'000	1'580'000	1'606'000	90 ± 6,5	91,5	91,4 ± 8,4
SHT	88'000	684'000	611'500	77 ± 6,5	95	68,9 ± 4,0

Tab. 6

Ausbeute für die Metaboliten 5-HTP-C¹⁴, 5-HIAA-C¹⁴, 5-HT-C¹⁴ nach dem Homogenisieren mit Methanol und Dünnschichtchromatographie auf Cellulose.

VII. ANWENDUNG: BESTIMMUNG DES ABBAUVERLAUFS VON 5-HTP-C¹⁴ UND 5-HT-C¹⁴ UNTER VERSCHIEDENEN BEDINGUNGEN

Abbau von 5-HTP-C¹⁴ im Rattenhirn nach intracisternaler Injektion

Um die Bildung von Serotonin und 5-HIAA aus 5-HTP in vivo Versuchen zu verfolgen, wurde Ratten 10 μ l einer wässrigen Lösung von 58 μ g D,L-5-HTP-C¹⁴ (spez. Akt. 3,8 mCi/mM) intracisternal injiziert. In Gruppen von 5 bis 22 wurden die Tiere in verschiedenen Zeitabständen dekapitiert. Das Gesamthirn wurde nach der beschriebenen Methode aufgearbeitet. Gemessen wurden einerseits jeweils 100 μ l des Überstandes, andererseits jeweils 100 μ l Blutplasma. Vom Extrakt wurden 200-400 μ l zur Bestimmung der Metaboliten chromatographiert.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 7 zusammengestellt. Zur besseren Übersicht wurden sie in den Abb. 18 und 19 nochmals dargestellt. In der Abb. 18 wurde die absolute Menge des radioaktiven Metaboliten angegeben in DPM gegen den jeweiligen Zeitpunkt der Dekapitation aufgetragen. In der Abb. 19 wurden die einzelnen Anteile der Metaboliten in Prozent der Gesamtradioaktivität zum jeweiligen Zeitpunkt aufgezeichnet. Beim Vergleich der beiden Zeichnungen ist ein anfänglich starker Abfall von 5-HTP-C¹⁴ festzustellen, der möglicherweise auf die Ausschwemmung von nicht gespeicherter Aminosäure zu führen ist. Es findet aber auch eine rasche Bildung von Serotonin statt, das aber auch schnell zur 5-HIAA abgebaut wird. Obwohl der in der Literatur beschriebene endogene Wert der 5-HIAA niedriger liegt als der Serotonin-Spiegel, ist hier zu jedem Zeitpunkt das Gegenteil der Fall. Die 5-HTP-Kurve flacht nach einer Stunde ab, um erst nach dem 7-Stunden-Wert seine Steigung wieder zu verändern, was auch für die Serotonin-Kurve gilt. Die anfänglich flache 5-HIAA-Kurve weist auf einen hohen Serotonin-Umsatz in der ersten Stunde hin. Vergleicht man die Halbwertszeiten in dem Zeitintervall 1-7 h, so erhält man

Zeit h	Anzahl Tiere	DPM/g Hirn und Anteil in % an der Gesamtradioaktivität		IPM/100 μ l Blutplasma	
		5-HTP-C ¹⁴	5-HT-C ¹⁴	5-HIAA-C ¹⁴	
1	13	253818 $\pm$ 32997	12657 $\pm$ 1581	24192 $\pm$ 4781	1090 $\pm$ 515
		87,35 % $\pm$ 1,01 %	4,38 % $\pm$ 0,42 %	8,27 % $\pm$ 0,9 %	
1	8	132446 $\pm$ 24517	7159 $\pm$ 1232	23137 $\pm$ 2075	541 $\pm$ 54
		81,13 % $\pm$ 2,26 %	4,41 % $\pm$ 0,41 %	14,83 % $\pm$ 2,22 %	
2	22	97493 $\pm$ 21152	5325 $\pm$ 1340	17284 $\pm$ 4161	291 $\pm$ 46
		81,12 % $\pm$ 2,15 %	4,47 % $\pm$ 0,61 %	14,41 % $\pm$ 1,79 %	
3	5	79174 $\pm$ 9286	3436 $\pm$ 1128	8102 $\pm$ 5,34	176 $\pm$ 15
		87,16 % $\pm$ 2,23 %	3,84 % $\pm$ 1,38 %	9,0 % $\pm$ 1,02 %	
4	6	71564 $\pm$ 17726	2455 $\pm$ 437	5460 $\pm$ 1113	174 $\pm$ 15
		89,83 % $\pm$ 1,68 %	3,15 % $\pm$ 0,42 %	7,02 % $\pm$ 1,31 %	
7	6	30757 $\pm$ 18009	930 $\pm$ 397	1698 $\pm$ 1152	83 $\pm$ 8
		91,53 % $\pm$ 3,53 %	2,99 % $\pm$ 0,63 %	5,49 % $\pm$ 2,94 %	
12	6	38736 $\pm$ 7351	753 $\pm$ 97	1233 $\pm$ 172	-
		95,08 % $\pm$ 1,1 %	1,88 % $\pm$ 0,28 %	3,12 % $\pm$ 0,83 %	

Tab. 7 Abbau von 5-HTP-C¹⁴ zu 5-HT-C¹⁴ und 5-HIAA-C¹⁴ nach intracisternaler Injektion von 5-HTP-C¹⁴ (1 μ l) in Funktion der Zeit.

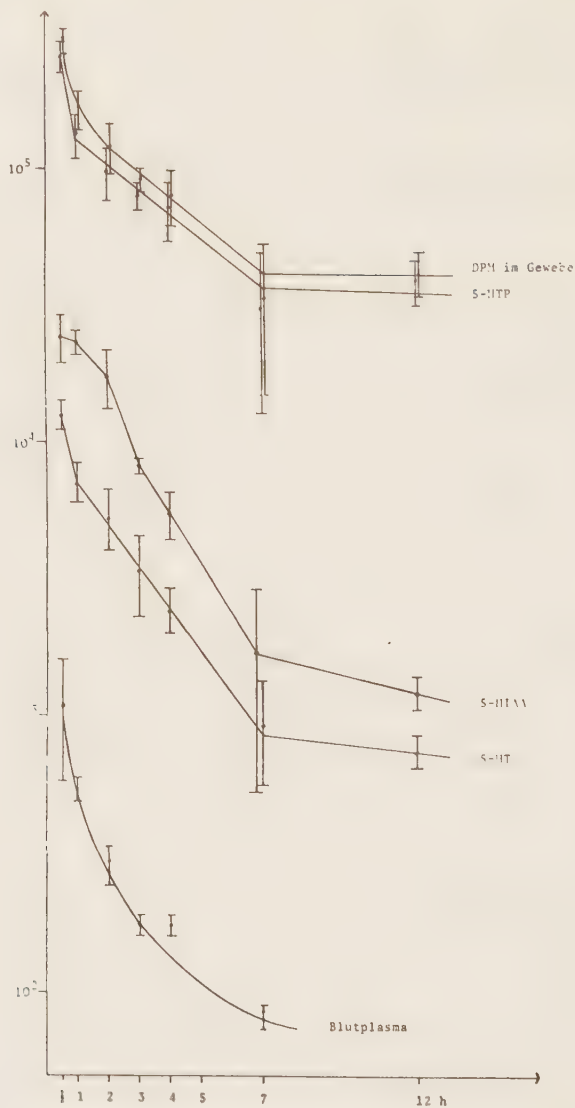


Abb. 18

Abklingen der Radioaktivität im Rattenhirn und Blutplasma nach intracisternaler Injektion von $1\mu\text{C}$ 5-HTP- C^{14} . Die Abszisse gibt den Zeitpunkt der Dekapit. nach der Injektion, die Ordinate die gemessenen DPM in logarithmischer Skala wieder.

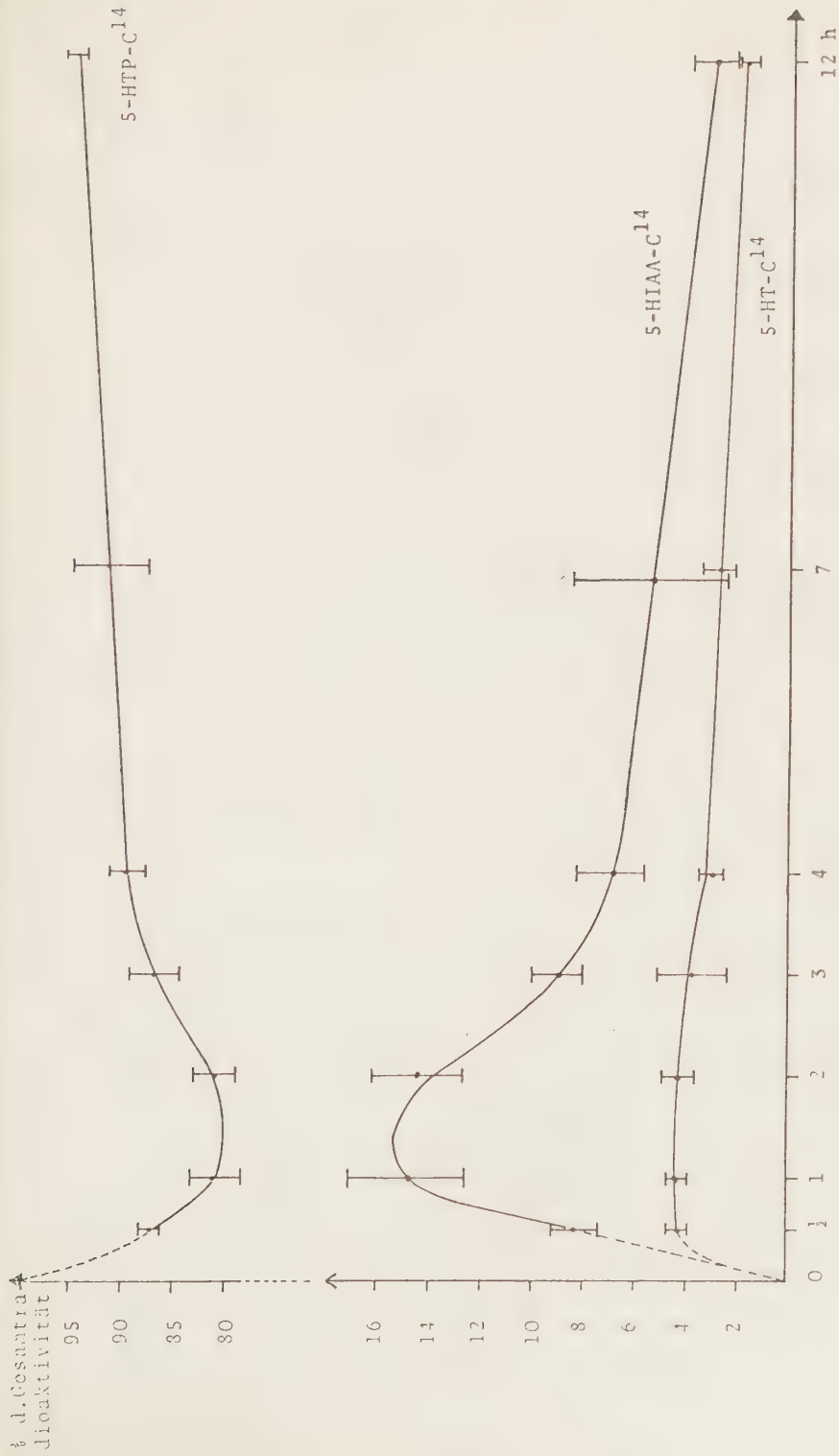


Abb. 19

Die in der Abb. 18 wiedergegebenen Werte von 5-HTP-C¹⁴, 5-HT-C¹⁴, 5-HIAA-C¹⁴ im Rattenhirn werden als prozentualer Anteil der Gesamtradioaktivität zum jeweiligen Zeitpunkt angegeben.

für das 5-HTP eine $T_{1/2} = 3,5\text{h}$, für das 5-HT = 2h , für die 5-HIAA = $1\text{h } 35'$.

Im Hirn ist endogenes 5-HTP nicht in messbarer Menge vorhanden. Aus der Abnahme von 5-HTP- C^{14} wurde an Hand dieses Versuches die Syntheserate von 5-HT- C^{14} berechnet. Es musste dabei angenommen werden, dass zu diesem Zeitpunkt kein wesentlicher Zustrom aus dem Liquor mehr stattfindet, dass aber auch das ins Hirn aufgenommene 5-HTP- C^{14} nicht in die Peripherie abwandert. Nur dann könnte die Abnahme von 5-HTP- C^{14} ein Mass für die Synthese des Serotonins geben, die folgendermassen berechnet wurde:

Die Abnahme von 5-HTP- C^{14} beträgt 15000 DPM/g/h im Zeitraum $1\text{h} - 7\text{h}$, was aus der Regressionsgerade der Graphik ersehen werden kann. Die spezifische Aktivität der Aminosäure (MG 220) beträgt $3,8\text{ mCi/mMol}$. Die Abnahme von radioaktivem 5-HTP berechnet sich demnach zu $1,75\text{ nMol/g/h}$. Dies entspricht einer Syntheserate von Serotonin von ebenfalls $1,75\text{ nMol/g/h}$. oder 308 ng/g/h .

Die für das Serotonin und die 5-HIAA angegebenen Halbwertszeiten sind scheinbare, da die Verbindungen fortlaufend aus den Vorstufen gebildet werden. Die wahren Halbwertszeiten dieser radioaktiven Verbindungen sind deshalb niedriger.

In einem anderen Versuch wurden Tiere nach dem gleichen Schema mit $4\text{ }\mu\text{g}$ 5-HTP- C^{14} (aber auch $1\mu\text{C}$) behandelt und nach einer, respektive zwei Stunden dekapitiert. Die Abb. 20 zeigt die Werte im Vergleich zu denen im ersten Versuch. Die 5-HTP- C^{14} -Werte liegen für den 1-Stundenwert für die mit vier Microgramm vorbehandelten Tiere relativ höher. Der Unterschied ist aber beim 2-Stundenwert nicht mehr vorhanden. Die Serotoninwerte liegen aber für die 4 Tiere beide Male relativ höher. Eine Stunde nach der Dekapitation ist also bei den mit $60\text{ }\mu\text{g}$ behandelten Tieren noch der Ausschwenneffekt für 5-HTP- C^{14} bemerkbar, der aber nach zwei Stunden aufgehoben ist.

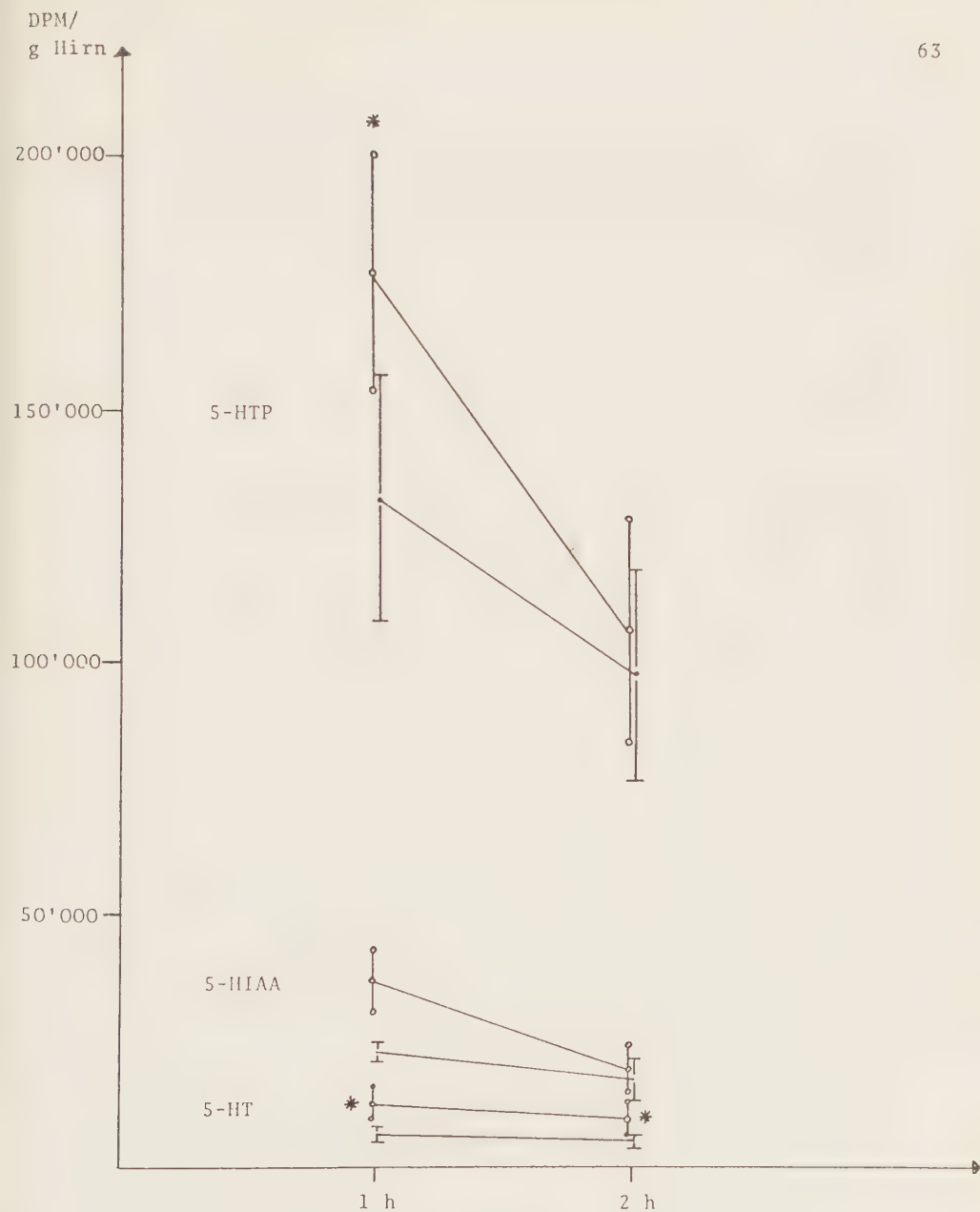


Abb. 20

Vergleich zwischen dem Abbau von 4γ (o) und 58γ (•) von 5-HTP-C¹⁴ (jeweils 1 μC) nach intracisternaler Injektion.

Aus diesem Versuch kann geschlossen werden, dass der Einfluss von Drogen auf den Serotonin-Stoffwechsel frühestens eine Stunde nach der Injektion von 5-HTP-C¹⁴ untersucht werden soll, da erst zu diesem Zeitpunkt endogen ähnliche Verhältnisse erreicht werden.

Einfluss von Drogen (Pargylin, Ro 4-1284) auf den Abbau von 5-HTP-C¹⁴

In diesem Abschnitt werden zunächst die Wirkungen von zwei sehr unterschiedlichen Drogen auf die Bildung und den Abbau von radioaktivem Serotonin studiert. Es wurden Pargylin und Ro 4-1284 gewählt, weil hier die qualitativen Effekte auf den Tryptophan-stoffwechsel bekannt sind. Diese Versuche kommen einem Test für die Bestimmungsmethode bei Anwendung von Drogen gleich. Die letzten Experimente dieses Kapitels behandeln den Einfluss von Imipramin auf den Serotoninstoffwechsel unter diesen Bedingungen.

Pargylin, ein MAO-Hemmer, geht mit dem Enzym Monoaminoxidase (EC 1.4.3.4.) eine kovalente Bindung ein⁹⁶. Bei Inkubationsversuchen konnte schon eine Stunde nach der Injektion von 25 mg/kg Pargylin i.v. eine vollständige Enzymhemmung festgestellt werden⁹⁵. Mit einer gaschromatographischen Methode wies Maruyama⁸⁹ einen Anstieg von endogenem Serotonin im Mäusehirn nach Gabe von 75 mg/kg Pargylin i.p. nach. Innerhalb von zwei Stunden erhöhte sich der Serotoninspiegel von 0,51 μ /g auf 1,35 μ /g, während das Abbauprodukt 5-HIAA auf 30 % des Ausgangswertes sank.

Wird der Aminspegel durch MAO-Hemmer signifikant erhöht, so ist durch Drogen vom Typ Reserpin oder Benzochinolizin das Gegenteil festzustellen.

Halaris⁹⁷ konnte elektronenmikroskopisch die Entleerung der Speichergranula von 5-HT und NA durch das Benzochinolizinderivat Ro 4-1284 nachweisen.

Im folgenden Versuch wurden die Tiere in drei Gruppen aufgeteilt: Kontrolltiere, Pargylintiere, Benzochinolizintiere. Alle erhielten zur Zeit $T = 0$ eine intracisternale Injektion von 58γ -5-HTP-C¹⁴ (1 μ C). Die Gabe von Pargylin (100 mg/kg i.p.) erfolgte zur Zeit $T = -5$ h, die von Ro 4-1284 (15 mg/kg i.p.) zur Zeit $T = -\frac{1}{2}$ h. Die Tiere wurden zur Zeit $T = 2$ h getötet.

Die Abbildung 21 und die Tabelle 8 zeigen, dass die Drogen keinen Einfluss auf den Abbau von 5-HTP-C¹⁴ haben. Pargylin erhöht jedoch den Serotoninspiegel auf das Sechsfache, während er durch Ro 4-1284 auf die Hälfte gesenkt wird. Die Wirkung des MAO-Hemmers wirkt sich auch deutlich auf den 5-HIAA-Gehalt aus, der deutlich absinkt. Benzochinolizin erhöht den 5-HIAA-Spiegel nicht signifikant.

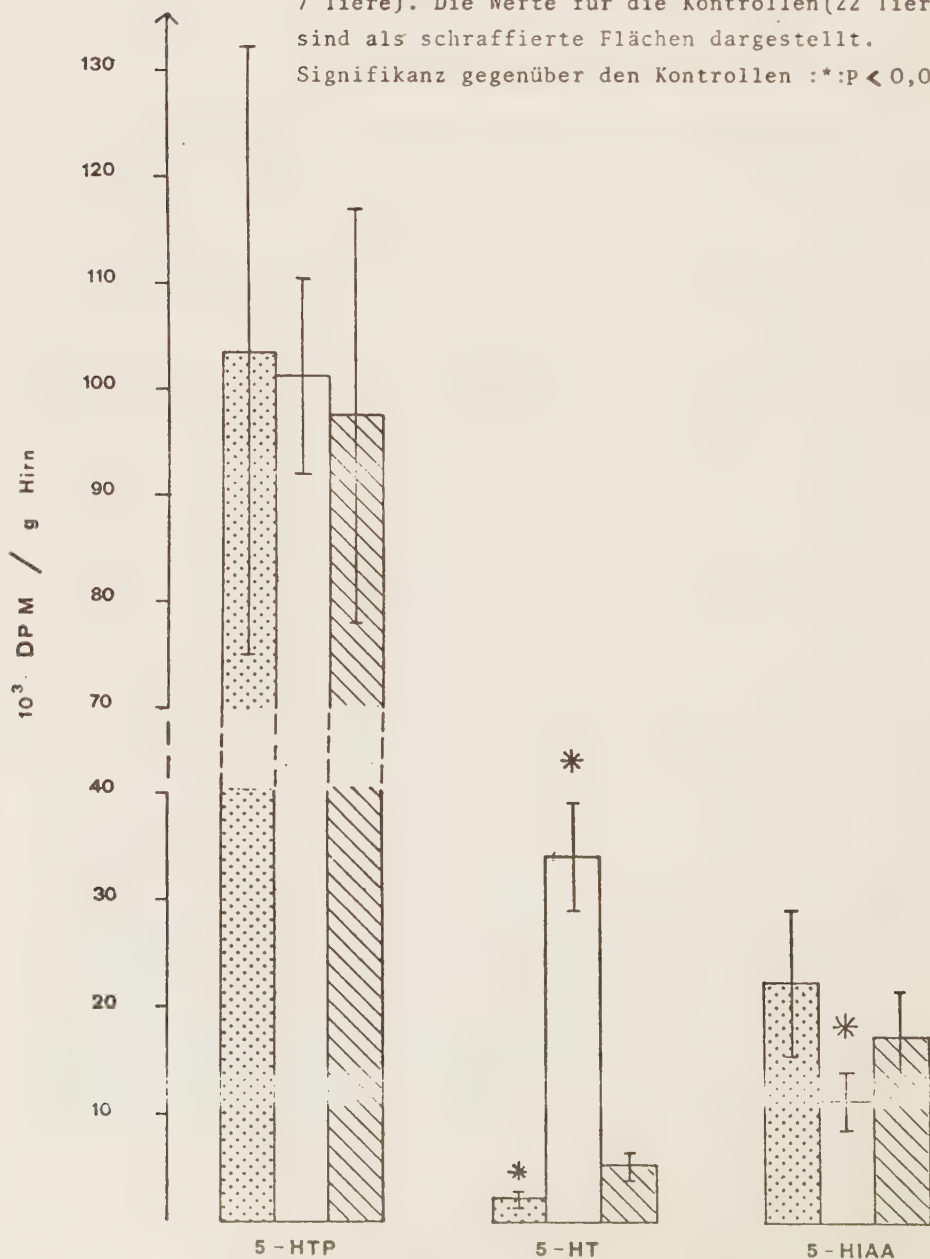
Die Signifikanzen werden mit Hilfe des U-Tests von Mann und Whitney berechnet, sowohl hier wie in den folgenden Versuchen.

Einfluss von Imipramin auf die Aufnahme und den Abbau von radioaktivem 5-HTP und 5-HT

Die Katecholamintheorie bezüglich der Depression setzt einen Mangel von Noradrenalin am Rezeptor voraus. Gewisse tricyclische Thymoleptika erhöhen diesen Anteil durch Hemmung des Rücktransportes des Amins in die Nervenendigung. In diesem Zusammenhang sind die Arbeiten von Carlsson wichtig, der fand, dass auch Serotonin durch Imipramin extraneuronal angehäuft wird¹⁰³. Dieser Nachweis gelang histochemisch nach intraventrikulärer Injektion von Serotonin. Doch war hiermit nicht geklärt, ob unter diesen Umständen der totale Serotoningehalt verändert wird. In einer späteren Arbeit wies derselbe Autor nach¹⁰⁶, dass das endogene Serotonin quantitativ nicht verändert wird. Wird jedoch die Synthese des Amins gehemmt, so lässt sich nachweisen, dass Imipramin die Freisetzung von Serotonin verzögert. Nach Carlsson

Abb. 21

Abbau von 58μ 5-HTP- C^{14} nach intracisternaler Injektion, nach Vorbehandlung (i.p.) der Tiere mit 100 mg/kg Pargylin (weisse Fläche, 8 Tiere) oder 5 mg/kg Ro 4-1284 (punktierte Fläche, 7 Tiere). Die Werte für die Kontrollen (22 Tiere) sind als schraffierte Flächen dargestellt. Signifikanz gegenüber den Kontrollen : * : $p < 0,01$.



Droge (Dosis i.p.)	Anzahl Tiere	DPM/g Gewebe		% Anteil an Gesamtradioaktivität			
		5-HTP	5-HT	5-HIAA	5-HTP	5-HT	5-HIAA
Pargylin (100mg/kg)	22	97493±21152	5325±1340	17284±4161	81,12±2,15	4,47±0,61	14,41±1,79
	8	101286±9260	34047*±4797	11461±2453	68,99*±2,24	23,14*±2,55	7,81*±1,60
Ro4-1284 (5mg/kg)	7	103649±28875	2397*±465	22301±6907	80,72±0,88	1,96*±0,5	17,25*±1,15

Tab. 8

Abbau von 5-HTP-C¹⁴ unter dem Einfluss von Drogen (s. Text). Signifikanz gegenüber den Kontrollen: *P < 0,02.

wird durch Imipramin der Nervenimpulsfluss der serotonergen Neuronen und damit auch die Freisetzung des Amins gehemmt. Dies könnte erklären, warum Veränderungen des endogenen Serotoningehalts durch Imipramin oder Chlorimipramin nicht gemessen wurden. Hier sollte jedoch mit chemischen Methoden nachgewiesen werden, ob die Aufnahme von exogenem Serotonin durch Imipramin gehemmt wird.

Nicht alle Depressionen können mit Imipramin erfolgreich behandelt werden. Es werden jedoch schon Versuche gemacht, Depressionen auch biochemisch zu klassifizieren, je nachdem, ob eine Störung im Noradrenalin- oder Serotoninstoffwechsel vermutet wird. Es werden deshalb kombinierte Therapien vorgeschlagen. So sind nach Coppen ²⁶ mit einer Kombination eines MAO-Hemmers und Tryptophan bessere Resultate erzielt worden als mit Imipramin allein.

Es stehen noch gründliche Untersuchungen betreffend der Wirkung der Kombination Imipramin - Tryptophan oder 5-Hydroxytryptophan aus.

Es soll hier die Wirkung von Imipramin auf die Aufnahme und den Abbau von intracisternal injiziertem 5-HTP im Hirn untersucht werden. Da 5-HTP hauptsächlich in der Nervenzelle dekarboxyliert wird, kann, im Gegensatz zum ersten Versuch, das Verhalten von intraneuronalem Serotonin unter dem Einfluss von Imipramin beobachtet werden.

Die Tabelle 9 gibt die Werte für 5-HT-C¹⁴ und seinem Abbauprodukt wieder: Eine Gruppe von Tieren erhielt 45 Minuten vor der Dekapitation 40 mg/kg Imipramin i.p. Diese wie auch die Kontrollgruppe wurde 30 Minuten vor der Dekapitation mit 115 ng 5-HT-C¹⁴ (38 000 IPM) i.cist. vorbehandelt. Der Serotoninspiegel ist bei den Imipramintieren signifikant erhöht, während die 5-HIAA nicht beeinflusst wird.

Die Abbildung 22 zeigt, dass die Aufnahme und der Abbau von 5-HTP-C¹⁴ durch 20 mg/kg Imipramin nicht gehemmt wird: Zwei

Abbau von 5-HTP-C¹⁴ nach einer Gabe von Imipramin. Zwei Stunden vor der Dekapitation erhielten beide Gruppen 53 μ g 5-HTP-C¹⁴ (1 μ Ci) i.c.v. Eine Gruppe wurde drei Stunden vor der Dekapitation mit 20 mg/kg Imipramin i.p. behandelt. Die Werte für die mit Imipramin vorbehandelten Tiere sind im Diagramm punktiert (4 Tiere). Kontrollen: 22 Tiere.

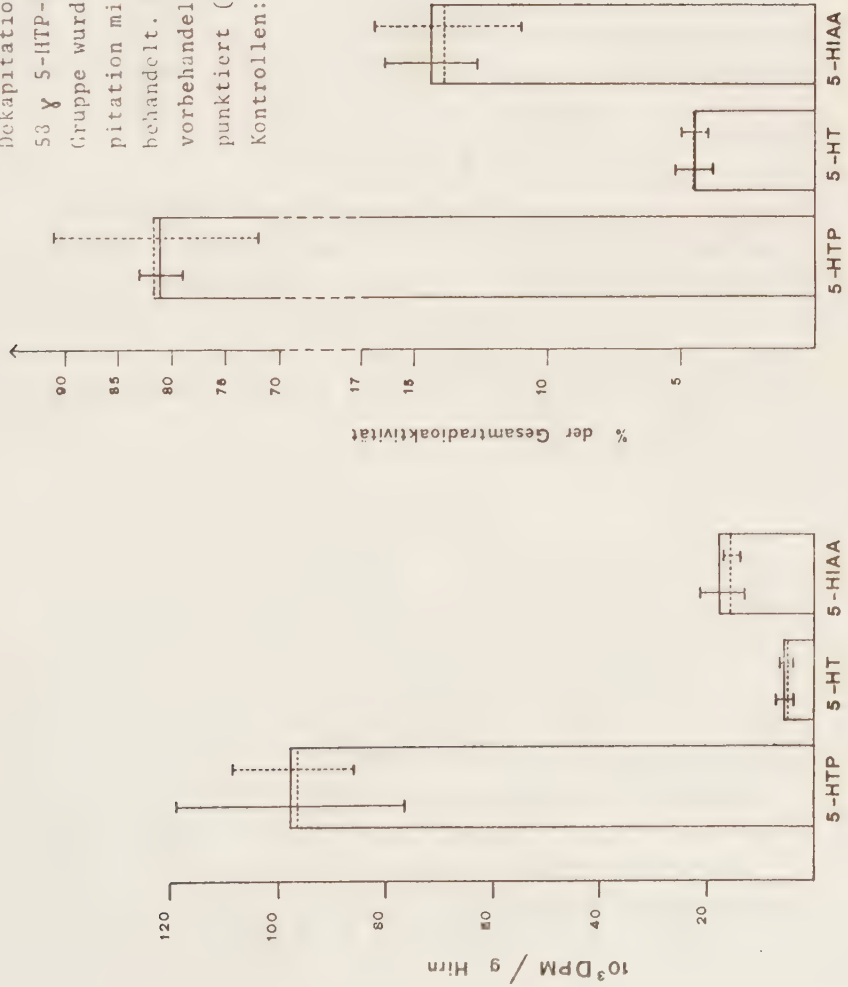


Tabelle 9

	DPM/g Hirn	
	5-HT	5-HIAA
Imipramin (11)	2857±658*	2509±482
Kontrollen (12)	2098±447	2357±669

Einfluss von Imipramin auf den Abbau von 5-HT-C¹⁴.

Eine Gruppe von Tieren erhielt 45 Minuten vor der Dekapitation 40 mg/kg Imipramin i.p.. Diese wie auch die Kontrollgruppe wurde 30 Minuten vor der Dekapitation mit 115 ng 5-HT-C¹⁴ (38000 IPM) i. cist. vorbehandelt.

* $P < 0,02$ im Unterschied zu den Kontrollen. Die Anzahl Tiere ist in Klammern angegeben.

Stunden vor der Dekapitation erhielten beide Gruppen 58 γ 5-HTP-C¹⁴ (1 μ Ci) i. cist.. Eine Gruppe wurde drei Stunden vor der Dekapitation mit 20 mg/kg Imipramin i.p. vorbehandelt.

Infolge der kleinen Dosis von Imipramin und dem grossen zeitlichen Abstand zwischen Injektion und Dekapitation ist eine Unwirksamkeit des Antidepressivums wegen seiner raschen Metabolisierung 78, 18 nicht auszuschliessen.

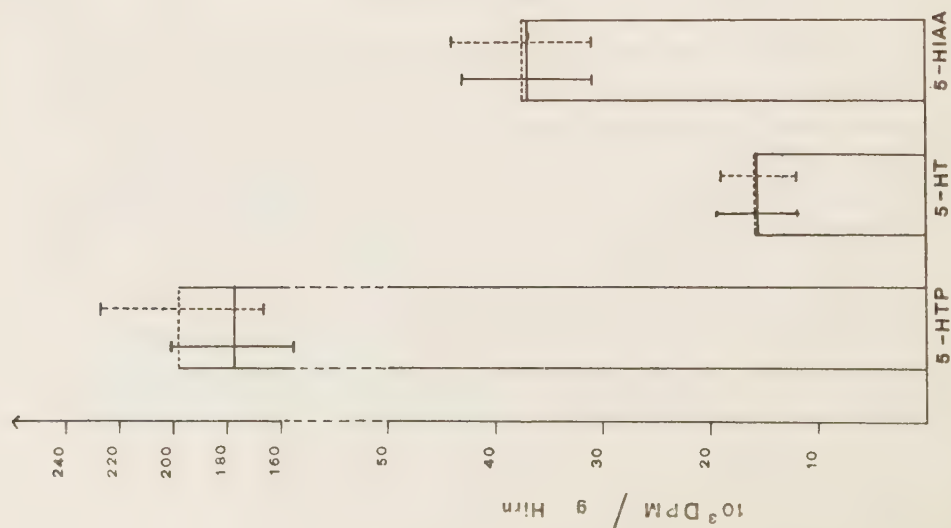
Die Dosis von Imipramin wurde deshalb im nächsten Versuch erhöht. Abb. 23 zeigt den Abbau von 5-HTP-C¹⁴ nach zweimaliger Gabe von Imipramin. Eine Stunde vor der Dekapitation erhielten beide Gruppen 4 γ 5-HTP-C¹⁴ (1 μ Ci) i.cist.. Eine Gruppe wurde einmal 70 Minuten und einmal 40 Minuten vor dem Töten mit jeweils 30 mg/kg Imipramin i.p. vorbehandelt. Die Werte der Imipramintiere sind gegenüber den Kontrollen nicht signifikant verändert. Doch zeigt sich die Tendenz, dass der Abbau von 5-HTP-C¹⁴ durch Imipramin verlangsamt wird, da für diese Tiere die 5-HTP-C¹⁴-Werte höher liegen als für die nicht vorbehandelten Ratten ($P < 0,1$).

In diesem Experiment (Abb. 23) wurde die Droge sowohl vor wie nach der Applikation der Aminosäure injiziert. In diesem Zusammenhang konnte Schildkraut³³ nachweisen, dass es eine Rolle spielt, ob die Gabe von Imipramin oder Desmethylimipramin vor oder nach der i. cist. Injektion von Noradrenalin erfolgt.

In einer letzten Versuchsreihe wurde deshalb der Abbau von 5-HTP-C¹⁴ in Abhängigkeit von verschiedenen Injektionszeiten von 40 mg/kg Imipramin i.p. gemessen. Zur Zeit $T = 0$ wurden alle Tiere mit 4 γ 5-HTP-C¹⁴ (1 μ Ci) i. cist. vorbehandelt und zur Zeit $T = 2$ Stunden getötet. Die Tiere wurden in sechs Gruppen, wovon eine Kontrollgruppe, aufgeteilt. Die anderen Gruppen erhielten zu verschiedenen Zeiten (resp. $T = -2$ h, -1 h, 0 h, $\frac{1}{2}$ h, 1 h, $1\frac{1}{2}$ h) eine einmalige Dosis von Imipramin (40 mg/kg i.p.). Die Abb. 24 und 24 a zeigen, dass die absoluten Werte von 5-HIAA zur Zeit $T = -2$ h und $T = 1$ h erhöht ($*P < 0,02$) beziehungsweise erniedrigt ($**P < 0,05$) sind im Vergleich zu den Kontrollwerten. Die Anzahl

Abb. 23

Abbau von 5-HTP-C¹⁴ nach zweimaliger Gabe von Imipramin. Eine Stunde vor der Dekapitation erhielten beide Gruppen 4 γ 5-HTP-C¹⁴ (1, μ Ci) i.cist.. Eine Gruppe wurde einmal 70 Minuten und einmal 40 Minuten vor der Dekapitation mit jeweils 30 mg/kg Imipramin i.p. vorbehandelt. Die Werte für die mit Imipramin vorbehandelten Tiere sind im Diagramm punktiert (4 Tiere). Kontrollen: 4 Tiere.



Tiere ist in Klammern angegeben. Der punktierte Bereich gibt die Standardabweichung für die Kontrolltiere wieder. Werden die relativen Werte in Prozent ausgedrückt betrachtet (Abb. 24 a), so kann ersehen werden, dass 5-HTP, vor dem Imipramin injiziert, erhöht ist ($T = 1 \text{ h}$, **1** $\frac{1}{2} \text{ h}$). Für 5-HIAA ist zum Zeitpunkt $T = 1\frac{1}{2} \text{ h}$ das Gegenteil festzustellen. Wird Imipramin vor der Aminosäure appliziert, liegen die Werte für das 5-HTP niedriger, für die 5-HIAA höher. Imipramin beeinflusst in diesem Experiment den Verlauf der Serotoninkurve nicht ersichtlich. Sie hat aber die Tendenz, dem Verlauf der 5-HIAA-Kurve zu folgen (Abb. 24 und 24 a).

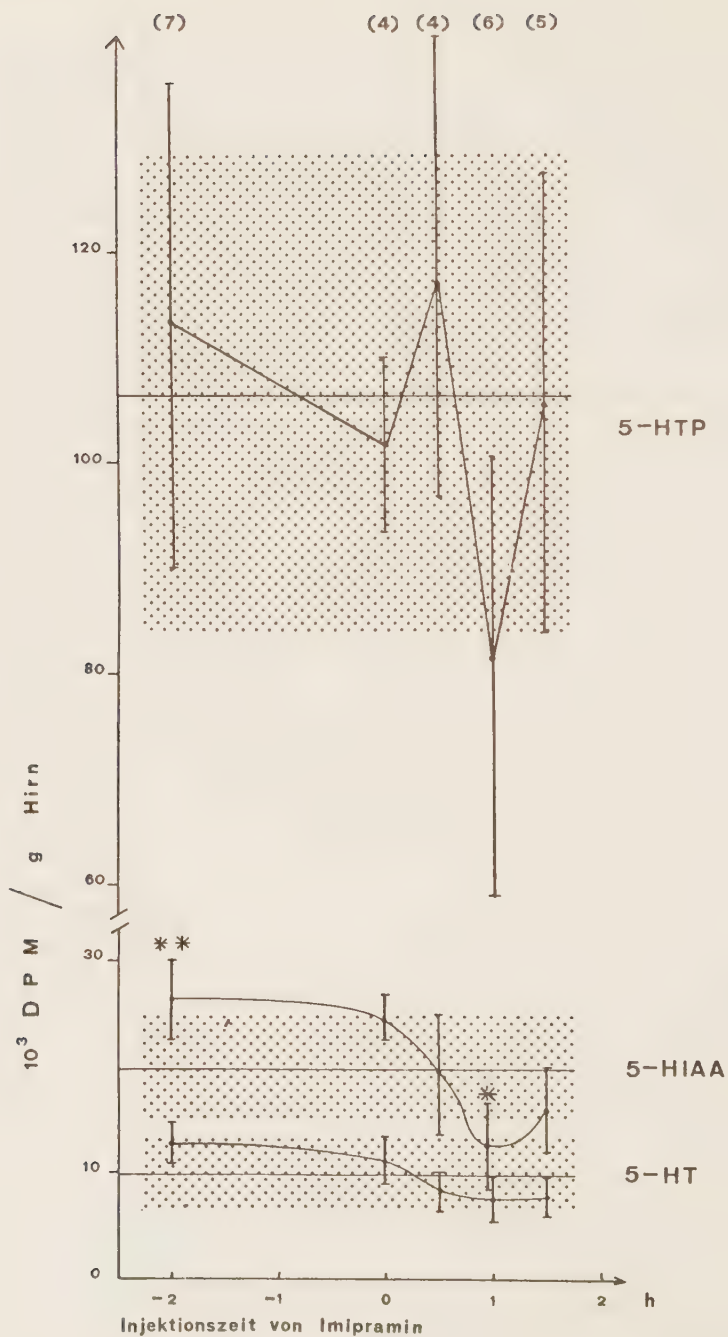


Abb. 24 Erklärung siehe Text

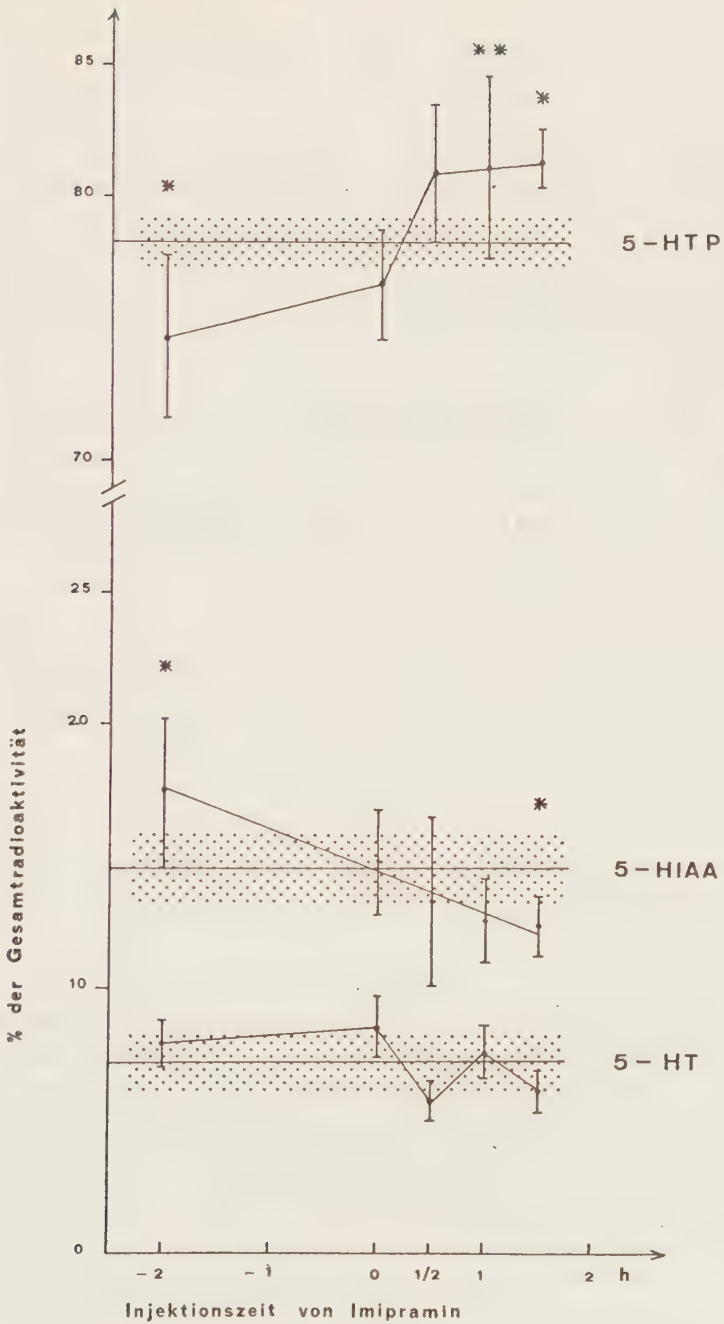


Abb. 24 a Erklärung siehe Text

VIII. AUTORADIOGRAPHIE NACH BEHANDLUNG MIT 5-HT-C¹⁴ (1)

Aghajanian¹³⁹ untersuchte die Verteilung von intraventrikulär injiziertem 5-HT-C¹⁴ an Ratten autoradiographisch. Die Intensität der Radioaktivität nimmt mit zunehmender Entfernung von den Ventrikeln ab, doch ist eine spezifische Verteilung in verschiedenen Regionen wie Septum, Amygdala, Caudate nucleus und Hypothalamus festzustellen.

Doch war es für die biochemische Bestimmung der Metaboliten von 5-HTP-C¹⁴ und die Interpretation der Versuche mit Drogen von Wichtigkeit, einige Kenntnisse über die Verteilung von 5-HTP-C¹⁴ und 5-HT-C¹⁴ nach intracisternaler Injektion zu gewinnen. Einige Tiere wurden wie folgt behandelt und nach der Methode von Schubert¹⁶³ präpariert:

Tier	intracisternal injiz. Indolder.	Überle- benszeit	Aufarbeitungsmethode
15	6 Ci (195 ng) 5-HT-H ³	30'	Gefriertechnik
16	"	3 h	"
17	"	30'	"
18	"	3 h	"
20	1 Ci (58) 5-HTP-C ¹⁴	30'	Formaldehydperfusion
21	"	3 h	"

Die Tiere 15 und 16 wurden 6 h vor der Serotoningabe mit 100 mg/kg Pargylin i.p. vorbehandelt. Es wird erhofft, durch eine Hemmung des Abbaus des Amins sein Eindringen in das Gewebe länger verfolgen zu können. Ausserdem ist bei den nicht mit einem MAO-Hemmer vorbehandelten Tieren die beobachtete Schwärzung vor allem auf den Metaboliten 5-HIAA zu beziehen und nicht auf 5-HT selber.

- (1) Herrn Dr. P. Schubert, MPI für Psychiatrie, möchte ich für die Ausführung der Autoradiographie und die Mithilfe bei der Auswertung des Versuches danken.

Infolge der kleinen Anzahl Versuchstiere und der unterschiedlichen Aufbereitungsmethoden können keine vergleichenden quantitativen Angaben gemacht werden. Der Unterschied zwischen mit dem MAO-Hemmer behandelten und den Kontrolltieren ist nicht auffallend.

Doch konnte nach der Injektion von tritiiertem Serotonin (Tier 17) Radioaktivität sowohl in der Umgebung des vierten (Abb. 25) und sogar des dritten Ventrikels (Abb. 26) festgestellt werden. Von hier aus ist eine relativ hohe Aktivität bis in den Thalamus, Hypothalamus und in den Nucleus habenulae gedungen. Eine geringere Aktivität zeigt sich weiter vorn im Septum und im Nucleus caudatus. Im Corpus callosum wurde die Anwesenheit von radioaktiv markiertem 5-HT nicht festgestellt.

Weiter zurück ist eine hohe Aktivität im Boden des 4. Ventrikels, im Vaguskerengebiet, eine geringere in den angrenzenden Teilen des Kleinhirns aus den Autoradiogrammen ersichtlich. Zwischen dem 4. und 3. Ventrikel konnte eine diffuse Anhäufung der Radioaktivität im periaqueduktalen Grau und im Nucleus interpeduncularis beobachtet werden.

Die Verteilung ist im allgemeinen diffus, doch finden sich auch Silberkorncluster, die auf eine spezifischere Aufnahme von tritiiertem Serotonin hinweisen.

Nach 5-HTP-C¹⁴ Gabe wird ein ähnliches Verteilungsmuster erhalten. Auch hier fallen die Anhäufungen auf, die auf ein spezifisches Verteilungsmuster hinweisen, insbesondere im Tuberkulum olfaktorium, teilweise auch im Hypothalamus, wie auch in den basalen Teilen des Hirnstammes und im dorsalen periaqueduktalen Grau. Doch lässt sich daraus nicht ermitteln, ob die "Cluster" auf das 5-HTP oder dessen Metabolit 5-HT zurückzuführen sind. Es ist jedoch letzteres anzunehmen, da Bédard⁵⁰ nur nach Hemmung der Decarboxylase und nicht nach intravenöser Injektion von 5-HTP ein spezifisches Verteilungsmuster der Aminosäure beobachten konnte.

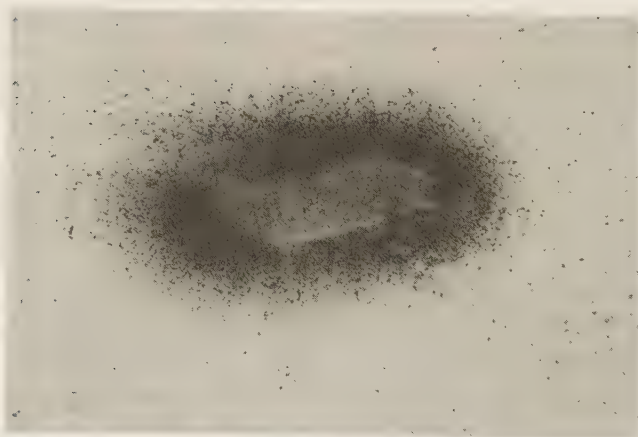
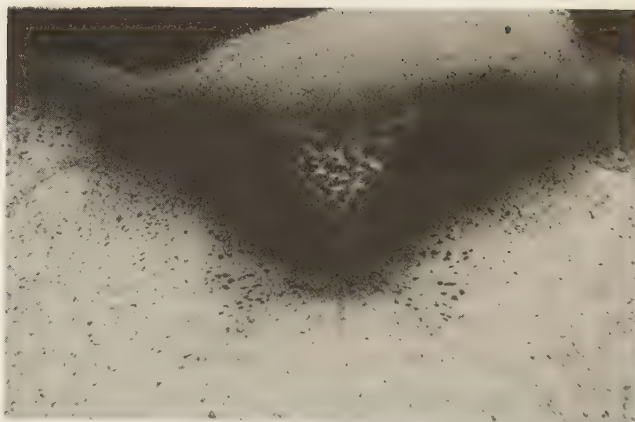


Abb. 25 und Abb. 26: Autoradiographie von Hirnschnitten einer Ratte nach intracisternaler Injektion von $6\mu\text{C}$ 5-HT-T. Die Abb. 25 (oben) gibt die Umgebung des vierten Ventrikels, die Abb. 26 die des dritten Ventrikels wieder.

IX. KOMBINATION DER METHODEN ZUR BESTIMMUNG VON 5-HTP-C¹⁴, 5-HT-C¹⁴, 5-HIAA-C¹⁴, TRYPTOPHAN, D. L-5-HTP UND SEROTONIN IM RATTENHIRN

In den letzten Abschnitten wurde über die getrennte Anwendung der Methoden berichtet. Die Bestimmung der radioaktiven wie auch der endogenen Metaboliten zusammen könnte die Frage klären, inwiefern die Zufuhr von 5-HTP den endogenen Serotoninstoffwechsel beeinflusst.

In diesem Experiment wurden deshalb die genannten Indolverbindungen in elf Rattenhirnen bestimmt. Sechs der Tiere erhielten eine Stunde vor der Dekapitation 1 μ C 5-HTP-C¹⁴ (58 γ) intracisternal. Die restlichen Kontrolltiere wurden nicht vorbehandelt.

Die Hirne wurden in der beschriebenen Weise aufgearbeitet und die Extrakte chromatographiert. Nach der Sichtbarmachung der Flecken mit dem DACA-Reagens wurden diese densitometrisch gemessen, wobei das Gesamt-Serotonin, das 5-HTP und das Tryptophan erfasst wurden. Nach dem Abschaben der radioaktiven Flecken konnte im Szintillationszähler Serotonin-C¹⁴, 5-HIAA-C¹⁴ und 5-HTP-C¹⁴ gemessen werden. Auf diese Bestimmung wird an Hand einiger Abbildungen näher eingegangen.

Abb. 27 zeigt ein Chromatogramm eines radioaktiven Extraktes (Bahn 2 + 4) und der Eichsubstanzen (Bahn 1 + 3 + 5). Serotonin und Tryptophan bilden gut messbare Flecken, 5-HTP nicht. Die Abb. 28 zeigt den Vergleich von Remissions- und Transmissionsmessung der Bahn 2. Die Remissionsmessung weist kaum Störungen durch den Untergrund auf, ist aber bedeutend weniger empfindlich.

Die Abb. 29 zeigt für ein ähnliches Chromatogramm die Schreiber-aufzeichnung der Banden 1 + 4 in Transmission. Auch hier fällt der hohe Untergrund auf, der die Messung erschwert. Die 5-HTP-Bande ist so weit auseinandergezogen, dass ihre Messung kaum möglich ist.



Abb. 27

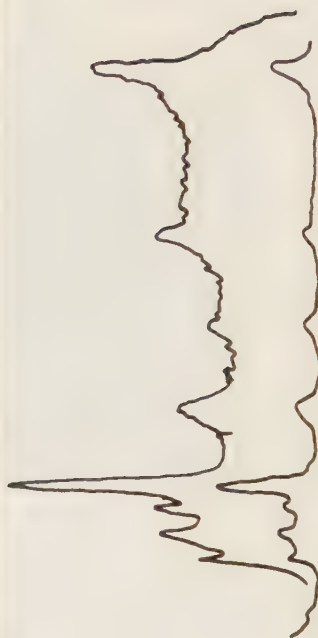


Abb. 28

Abb. 27: Chromatographie eines radioaktiven Extrakts. Von links nach rechts: Auf den Bahnen 1, 3, 5 wurden Eichsubstanzen in steigenden Mengen, auf den Bahnen 2, 4 Aliquots eines Extrakts entwickelt.

Abb. 28: Schreiberaufzeichnung der Bahn 2 (vergl. Abb. 27). Für die Kurve links erfolgte die Messung in Transmission, für die Kurve rechts in Remission.

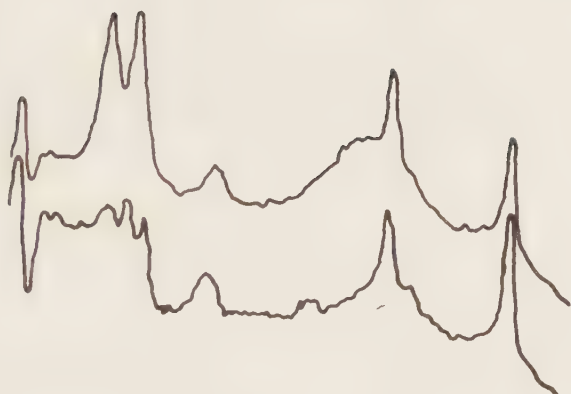


Abb. 29: Chromatogramm eines radioaktiven Extraktes. Schreiber-
aufzeichnung der Messung in Transmission. Oben: Bahn mit Eich-
substanzen, 5-HT (15 ng), D,L-5-HTP (60 ng), L-Try (60 ng).
Unten: Bahn eines Aliquots eines Extraktes.

In der Tab. 10 wurden die Messwerte des gesamten Experimentes zusammengestellt:

Die Tryptophan- und Serotoninwerte werden durch die Gabe von 58μ 5-HTP- C^{14} nicht signifikant beeinflusst.

Die durch die Densitometrie erhaltenen Werte der vorbehandelten Gruppe setzen sich aus dem endogenen und dem aus dem radioaktiven 5-HTP gebildeten Serotonin zusammen. Letzteres kann, unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität, in ng angegeben werden: $6125: 48 = 128 \text{ ng/g}$.

Die Differenz zwischen dem Wert für das Gesamt-Serotonin und diesem soeben ermittelten gibt den endogenen Aminspiegel: $1052 \pm 300 \text{ ng/g}$.

Diese Ergebnisse werden in der Abb. 30 nochmals zusammengestellt. Aus ihr kann ersehen werden, dass das endogene Serotonin nicht in dem Masse verringert wird, in dem radioaktives Amin gebildet wird. Beim Vergleich der ersten und der dritten Kolonne wird ein $F = 0,46$ (U-Test), beim Vergleich der zweiten und dritten ein $F = 0,11$ erhalten. Das radioaktive Amin verteilt sich nicht im Gesamthirn. Analysiert wurde aber das Gesamthirn. Da aber eine Tendenz zur Abnahme des endogenen Serotonins aus den unterschiedlichen F -Werten interpretiert werden könnte, ist eine regionale Verdrängung des endogenen Serotonins nicht ganz auszuschliessen.

Gruppe	5-HTP		1		5-HT		2		Try ng/g Gew.	5-HIAA		Prozent. Anteil an der Gesamtradioaktivität	
	ng	DPM	DPM ng	DPM	ng	DPM	DPM ng	DPM		DPM/g Gewebe	5-HTP	5-HT	5-HIAA
Kontrollen	-	-	-	1171	-	-	-	3880	-	-	-	-	-
(5)				±188				±860					
5-HTP-C ¹⁴	1840	135500	73	1180	6125	5,4	4500	82,47	3,74	22500	13,79		
(6)	±350	±38500	±13	±300	±540	±1,7	±1100	±1,63	±0,21	±2000	±1,53		

Tab. 10

Abbau von 5-HTP-C¹⁴ im Hirn der Ratte und Einfluss auf den endogenen Tryptophanstoffwechsel.

Die Kontrollen sind unbehandelte Tiere. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl Tiere pro Gruppe wieder.

1 vorgegebenes 5-HTP-C¹⁴ : 38 DPM/ng

2 Vorgegebenes 5-HT-C¹⁴ (aus 5-HTP-C¹⁴) : 48 DPM/ng.

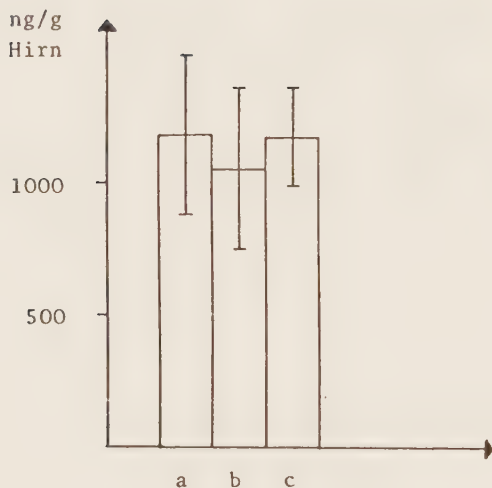


Abb. 30

Einfluss von 5-HTP-C^{14} auf den endogenen Serotonin-
gehalt im Rattenhirn.

a: Gesamt-Serotonin (5-HT-C^{14} + endogenes 5-HT)

b: Endogenes 5-HT der mit 5-HTP-C^{14} vorbehandelten
Tiere

c: Endogenes 5-HT der Kontrolltiere.

X. MATERIAL

Radioaktiv markierte Indolderivate:

D, L-5-Hydroxytryptophan-3-C¹⁴. 3,8 mC/mM. NEN Boston

D, L-5-Hydroxytryptophan-3-C¹⁴. 58 mC/mM. RC Amersham

5-Hydroxytryptamin-3-C¹⁴ Creatininsulfat Monohydrat. 56 mC/mM.
RC Amersham

5-Hydroxytryptamin-T(G) Creatininsulfat Monohydrat 8,5 C/mM.
RC Amersham

5-Hydroxyindolessigsäure -C¹⁴ (¹⁴COOH). 64 mC/mM. NEN Boston

Drogen, Chemikalien:

Ro 4-1284 (2-Hydroxy-2-ethyl-3-isobutyl-9,10-dimethoxy-1,2,3,4,
6,7-hexahydrobenzo(a)chinolizin) Hoffman-La Roche Grenzach

Imipramin (Tofranil)^R (N-(γ-Dimethylaminopropyl)-iminodibenzyl-
hydrochlorid) Thomae/Geigy Biberach

Pargylin (mo 911) (N-Methyl-N-benzyl-2-propylamin hydrochlorid)
Abbott

Reserpin (Serpasil)^R

p-Dimethylaminozimtaldehyd Fa. Schuchardt München

D, L-5-Hydroxytryptophan, Tryptophan, Serotonin, 5-HIAA, Tryptamin,
DMT, Bufotenin, 5-Methoxyindolessigsäure, Indolessigsäure, Melatonin:
Fluka, Buchs CH

Faserförmige Cellulose MN 300 Macherey, Nagel Düren

Mikrokristalline Cellulose Avicel Merck Darmstadt

Fertigplatten (Cellulose, Polyamid) Schleicher, Schuell Dassel.

Die anderen Reagenzien sind, soweit erhältlich, analysenreine
Substanzen der Fa. Merck Darmstadt.

Geräte:

Szintillationszähler: Tri-Carb 3214 Packard

Scanner: Berthold

Zentrifuge: Sorvall RC-2

Auftragegerät: Von Waessle und Sandhoff, Prototyp zum Linomat Camag

Plattenbeschichtungsgerät: Fa. Camag

Densitometer: Zusatzgerät zum PMQ II Spektralphotometer Zeiss
Oberkochen.

XI. METHODIK UND BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

1. Bestimmung von 5-HTP-C¹⁴, 5-HT-C¹⁴ und 5-HIAA-C¹⁴ in Hirn-homogenaten

1.A. Aufbereitung des Hirns

Die intracisternale Injektion der radioaktiv markierten Stoffe wird zu zweit vorgenommen. Einer hält mit einer Hand die Ratte am Körper, mit der anderen das Tier so am Kopf, dass ein Winkel von etwa 90° zwischen dem Rückgrat und dem Schädel entsteht. Mit Hilfe einer 50 μ l Hamilton-Spritze können nun 10 bis 20 μ l der Lösung in die Cisterna Magna gespritzt werden: Durch die Beugung des Kopfes wird der hintere Teil des Occiputs hervorgehoben. Direkt kaudal ist eine Vertiefung bemerkbar, die sich zwischen dem Schädelknochen und der Wirbelsäule befindet. Hier wird die Nadel langsam eingeführt, bis auf leichten Widerstand gestossen wird. Wird diese Membran durchstossen, befindet sich die Spitze der Nadel in der Magna Cisterna.

Drogen wurden auch intraperitoneal (i.p.) appliziert. Sowohl die Drogen wie auch die markierten Verbindungen wurden in physiologischer Kochsalzlösung appliziert.

Die Dekapitation der Ratten erfolgt direkt hinter dem Kopf. So schnell wie möglich wird die Schädeldecke sagittal aufgeschnitten und das Hirn mit einem Teil des Rückenmarkes, aber ohne den Bulbus olfactorius, herauspräpariert.

Bei Bestimmungen im Gesamthirn wird das Rückenmark 1 mm hinter dem Kleinhirn abgeschnitten.

Bestimmungen im Stammhirn: Es wird durch Abheben der Grosshirnhemisphären vom Colliculus superior und inferior in rostraler Richtung und dann durch zwei Schnitte von der ventralen Hirnoberfläche zum Corpus Callosum um den Hypothalamus und dem Chiasma opticum bereitet.

Die auf diese Weise erhaltenen Hirnteile werden in eiskalte 0,4 n Perchlorsäure gelegt. Vor dem Homogenisieren werden sie mit physiologischer Kochsalz-Lösung gewaschen. Homogenisiert wird mit der anderthalbfachen bis doppelten Menge Methanol (Volumen) im Vergleich zum Hirngewicht (Gewicht) in einem 5ml Glashomogenisator. Das Homogenat wird eine halbe Stunde im Eisschrank aufbewahrt und anschliessend eine halbe Stunde lang bei 31 000 g in Kunststoffröhrchen in der Sorvallzentrifuge zentrifugiert (bei 16 000 UPM).

Der Überstand wird vom festen Rückstand getrennt. 100 µl der flüssigen Phase werden in ein Zählröhrchen pipettiert, das 15 ml Szintillatorlösung und 4 ml Methanol enthält. Die Grundlösung (Szintillatorlösung) wird durch Zugabe von 25 g PPO (= 2,5-Diphenyloxazol) und 1,5 g Dimethyl-POPOP (= 1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl)-Benzol) zu 5 Liter reinem Toluol erhalten. Die Impulse werden im Tri-Carb-Szintillationszähler von Packard bei folgender Einstellung gezählt:

Fenster: 50-1000 und 90-1000, bei einer Verstärkung von 25 %.

Extrakte, die nach diesem Test kaum Radioaktivität aufweisen, werden nicht weiter verarbeitet. Dies tritt dann auf, wenn die intracisternale Injektion nicht korrekt erfolgte.

1.B. Chromatographie der Extrakte

a. Herstellung der Dünnschichtplatten

16 g der MN 300 Cellulose werden mit 100 ml Wasser vermischt und während einer Minute kräftig mit einem ESGE-Rührer homogenisiert. Mit Hilfe des Streichgerätes der Firma Camag werden etwa fünf 4 mm dicke mit Aceton entfettete Glasplatten mit dem Brei bei einer Einstellung von 0,3 mm Schichtdicke beschichtet. Die Platten werden anschliessend an der Luft getrocknet aufbewahrt und frühestens am nächsten Tag verwendet.

b. Durchführung der Chromatographie

200 μ l (in manchen Fällen 400-500 μ l) des Extraktes werden 2 cm über dem unteren Plattenrand auf eine Breite von 8 cm von Hand aufgetragen, so dass bei einer Plattengrösse von 20 x 20 cm pro Platte zwei Aliquots des Extrakts nebeneinander appliziert werden können. Einige Mikroliter eines Gemisches von D,L-5-HTP, 5-HT und 5-HIAA (jeweils etwa 200 ng) werden mit aufgetragen.

Die Chromatographie erfolgt vom direkten Licht geschützt in Desaga-Trennkammern. Die Platten werden beinahe senkrecht in die Kammern gebracht und mit dem Laufmittel n-Butanol - 5n Essigsäure (100:35) entwickelt. Für die Laufstrecke von 14 cm werden etwa 2,5 Stunden benötigt. Die Chromatogramme werden an der Luft vor Licht geschützt getrocknet.

c. Anfärben der Dünnschichtchromatogramme

Die Chromatogramme werden gleichmässig, aber nicht bis zur Transparenz mit dem DACA-Reagens besprüht. Das Reagens wird durch Lösen von 2 g p-Dimethylaminozimtaldehyd in 100 ml 6 n Salzsäure und 100 ml Aethanol erhalten. Die Lösung kann im Kühlschrank mehrere Wochen aufbewahrt werden. Obwohl die Platten nur leicht besprüht werden, ist bei der Messung im Szintillationszähler mit stärkerer Löschung zu rechnen. Sie wird erniedrigt, indem die Eichsubstanzen seitlich aufgetragen und nach der Entwicklung durch entsprechendes Abdecken allein angefärbt werden. Die das radioaktive Extrakt enthaltende Bande kann an der Stelle mit gleichem R_f -Wert wie folgt ausgekratzt werden.

1.C. Messung der Metabolite

Die durch Blau- oder Violettfrärbung erkenntlichen Zonen mit 5-HTP, 5-HT und 5-HIAA werden mit einem spitzen Gegenstand umrandet und nach der Methode von Giese (nicht veröffentlicht) ausgekratzt:

Zwei Löcher werden in den Plastikdeckel eines Packard-Zählröhrchens gebohrt, durch die zwei Glasröhrchen mit einem Innendurch-

messer von etwa 2 mm und einer Länge von 10 cm geführt werden. Eines wird um 120° , das andere um 90° gebogen. Letzteres wird mit einem Schlauch an eine Wasserstrahlpumpe verbunden. Der Deckel mit den angebrachten Glasröhrchen kann nun auf ein mit Zählflüssigkeit gefülltes Zählgefäß geschraubt werden, so dass die Glasröhrchen nicht in die Flüssigkeit tauchen. Wird nun die Cellulose auf der DC-Platte mittels eines Spatels gelöst, kann das Pulver in das thixotrope Gel gesaugt werden. Das Gel wird durch die Mischung von 40 g thixotropem Gel-Pulver mit einem Liter Grundlösung erhalten. Vorher wurde der Leerwert der Zähl-lösung gemessen. Die Proben können nach Angleichen in der Kühltruhe des Packards bei folgender Einstellung gemessen werden: Fenster 50-1000 und 90-1000. Verstärkung 15 %. Je nach Konzentration des radioaktiven Produktes während einer Zeit von 3×1 Minuten bis 3×10 Minuten. An Hand einer vorher ermittelten Löschkurve kann aus der Zählrate (IPM) die Zerfallsrate (DPM) ersehen werden.

2. Densitometrische Bestimmung von Indolderivaten in Hirnhomogenaten

2.A. Aufbereitung des Hirns

Die Dissektion und das Homogenisieren erfolgen auf die in 1.A. beschriebene Weise. Bei kleineren Gewebemengen wird aber die Zerkleinerung des Gewebes durch Ultraschall vorgezogen.

Das Gewebe wird in ein etwa 2 ml fassendes, mit Deckel verschliessbares Eppendorfröhrchen gebracht und mit einem dünnen Spatel zerkleinert. Im Vergleich zum Hirngewicht wird die anderthalbfache Menge Methanol dazugegeben und das Röhrchen verschlossen in Eiswasser gebracht. Die Homogenisierung mit dem Ultraschallgerät "Sonifier" dauert etwa drei Minuten, wozu die Spitze der Schallquelle von aussen an die Wand des Röhrchens gedrückt wird.

Das Eppendorfgefäß wird auf ein mit einem speziellen Plastikeinsatz versehenen Sorvall-Zentrifugenröhrchen aufgesetzt und im

Rotor SS 34 während einer halben Stunde bei 31 000 g zentrifugiert. Sodann kann der Überstand chromatographiert werden.

2.B. Chromatographie der Extrakte

18 g Avicel-Cellulose werden während einer Minute mit einem ESGE-Rührer vermischt. Die Suspension reicht zum Bestreichen von etwa 7 Platten mit dem Camag-Gerät. Ansonsten gilt die gleiche Vorschrift wie für die MN-Platten.

Zur quantitativen Bestimmung von Tryptophan, 5-HTP und 5-HT wurden die Proben sowie die Eichsubstanzen nach folgendem Schema aufgetragen: (Auftragegerät von Wässle-Sandhoff)

14	26	14	26	14	Auftragbreite (mm)
15		25		35	Eichsubstanzen (μ l)
	50		50		Gewebeextrakt (μ l)

Gewebeextrakt und Eichlösung werden alternierend aufgetragen, um Fehler wegen etwaigen Ungleichheiten des Untergrundes möglichst zu vermeiden. In der Regel enthielt die Eichlösung Tryptophan (4 ng/ μ l), 5-HTP (4 ng/ μ l) und 5-HT (1 ng/ μ l).

Das Laufmittel setzt sich zusammen aus:

Butanon (-2) - Aceton - 2,5 n Essigsäure (40:20:20). Die Laufzeit beträgt 1,5 Stunden bei einer Laufstrecke von 12 cm.

Nach der Entwicklung werden die Platten an der Luft oder kurz mit dem Föhn getrocknet.

2.C. Messung der Chromatogramme

Die Chromatogramme werden mit DACA-Reagens möglichst gleichmäßig besprüht, jedoch nicht bis zur Transparenz, wie dies z.B.

bei der Anwendung des Kaegi-Miescher-Reagens gemacht wird, da ein zu hoher Untergrund eine Auswertung stört. Zur Standardisierung des Vorganges werden die Chromatogramme während zwei Minuten bei 60° im Trockenschrank erwärmt.

Gleich darauf werden die Platten in die dafür vorgesehene Halterung des Zusatzgerätes von Zeiss gelegt und bei folgenden Einstellungen gemessen:

Spaltbreite beim Monochromator 0,06. Spaltlänge 10 mm.

Lichtquelle: Glühlampe.

Wellenlänge $610\text{ m}\mu$ bei blauen Flecken (z.B. 5-HT, 5-HTP, Bufotenin)

Wellenlänge $595\text{ m}\mu$ bei violetten Flecken (Tryptophan)

Tischgeschwindigkeit 3, Schreibergeschwindigkeit 10.

Der Messkopf wird so nahe wie möglich an die Platte herangebracht. Im weiteren wird für die Messung nach der zum Gerät gehörenden Vorschrift vorgegangen:

Durch manuelles Verschieben des Plattenuntersatzes wird die Stelle der grössten Absorption des Fleckes gesucht. Sodann wird der strichförmige Farbfleck in Richtung der Y-Achse der Platte automatisch verschoben, die Absorption registriert, nachdem vorher die Basislinie auf $E=0$ eingestellt wurde.

Die Peaks werden ausgeschnitten. Auf Grund der gleichmässigen Dichte des Papiers sind die ausgeschnittenen Peaks direkt vergleichbar mit der Peakfläche, die selber ein Mass ist für die aufgetragene Substanzmenge.

Die Messwerte der Eichpunkte werden auf mm-Papier aufgetragen. Mit Hilfe der Eichkurve und des Mittelwertes der Peakgewichte des zu bestimmenden Extraktes kann die Menge des Indolderivates ersehen werden.

3. Koppelung beider Methoden zur Bestimmung radioaktiver und nicht markierter Metaboliten

Diese Methode wird aus den beiden vorhergehenden abgeleitet. Die Aufbereitung des Hirns erfolgt nach 1.A., bei kleinen Gewebe-

stücken nach 2.A. Das nach der Zentrifugation erhaltene Extrakt wird chromatographiert nach 2.B., wobei auch hier als Eichsubstanzen nicht radioaktiv markierte Substanzen verwendet werden.

Messung der Chromatogramme: Nach der densitometrischen Bestimmung der Metabolite nach 2.C. können sie wie in 1.C. beschrieben ausgekratzt und direkt im Szintillationszähler gemessen werden.

Diskussion

1. Densitometrische Bestimmung

In der vorliegenden Arbeit wurde Tryptophan und Serotonin aus dem Rattenhirn densitometrisch auf der Dünnschichtplatte nach Anfärben mit dem DACA-Reagens bestimmt. Die Wahl des Laufmittels wurde so getroffen, dass eine möglichst vollständige Trennung der in Frage kommenden Tryptophanmetaboliten, sowie anderer, ebenfalls mit DACA eine farbige Verbindung eingehenden Stoffe, auf der Celluloseschicht gewährleistet war. Die im Handbuch von Stahl¹³⁷ aufgeführten Laufmittel gelten nur für Kieselgel, weshalb eine Trennung mit dem Laufmittel von Giese¹³⁶ versucht wurde. Es eignet sich jedoch vor allem das Laufmittel B zur Trennung von Serotonin, Tryptophan, 5-HIAA und Harnstoff. Diese Verbindungen treten im Hirn in nennenswerten Mengen auf und werden mit der Methode erfasst. Die mitaufgeführten Derivate Tryptamin, DMT, Bufotenin, 5-MeOIAA, IAA und Melatonin sind im Gesamthirn nicht in Mengen nachgewiesen worden, die die Bestimmung stören. Melatonin spielt zwar in der Epiphyse eine wichtige Rolle und kann dort auch in grösseren Mengen bestimmt werden, die aber bei Gesamthirn- oder Stammhirnbestimmungen vernachlässigt werden können. Ausserdem fällt der R_f -Wert von Melatonin mit dem von 5-HIAA zusammen, die nicht densitometrisch bestimmt wird. Andere Indolderivate, die nicht untersucht wurden, wie Serotoninsulfat, 5-Hydroxyindol-acetaldehyd und 5-Hydroxytryptophol mögen ebenfalls eine Rolle im ZNS spielen, wurden aber bisher auch nur in Spuren nachgewiesen. So beschrieb Hidaka⁶⁰ ein Enzym im Rattenhirn, welches Sulfat an Serotonin bindet. Gal⁶¹ (1972) wies die Bildung dieses Sulfates im Hirn in vivo nach, jedoch nur in kleinsten Mengen und bei Verwendung eines MAO-Hemmers und von Probenecid gleichzeitig. Diese Droge hemmt den Abtransport des Sulfates aus dem Hirn und bewirkt

damit diese Aufhäufung im ZNS.

Der weitere in Frage kommende Metabolit, 5-Hydroxytryptophol, wird auf Grund seiner Struktur ebenfalls einen R_f -Wert um 98 aufweisen. In vitro zeigte Klein ¹³⁴, dass in Epiphysenkulturen nur 15 % des Serotonins zu diesem Alkohol abgebaut wurde.

Inzwischen hat auch Heathcote ¹²⁰ ein saures, Butanon-haltiges Laufmittel zur Trennung von Harnstoff und Metaboliten des Tryptophans erfolgreich angewendet. Doch wird die Anwendung von ketonischen Laufmitteln im Zusammenhang mit Indolderivaten von anderen Autoren kritisiert. Tanimukai ¹⁴¹, ¹⁴⁰ bemerkte, dass Aceton mit Indolverbindungen Kondensationsprodukte eingeht, wenn diese mit dem Keton ausgeschüttelt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden bei der Dünnschichtchromatographie Verdoppelungen der Flecken festgestellt, die auf vermutliche Nebenprodukte hinweisen. Die Doppelflecken traten aber auch mit alkoholischen Laufmitteln auf. Es gab keine Hinweise für die Bildung von Doppelflecken infolge einer etwaigen Kondensation von Serotonin mit Butanon oder Aceton. Die Interpretierung nach Becket ¹³⁵ ist einleuchtender. Die Cellulose enthält Carboxylgruppen, die teilweise ionisiert sind. Durch das saure Laufmittel liegt ein Teil des Serotonins als Salz vor, welches an die Carboxylgruppe angelagert wird. Dieses wurde hier insofern bestätigt, dass bei der Entwicklung der Platten das Laufmittel deutlich in zwei Phasen zerfiel. Die wässrige Phase lief nicht bis zur Front, sondern bildete eine zweite auf der Höhe des Serotonins, besonders wenn das Laufmittel A auf faserförmiger Cellulose lief. In diesem Falle wies Serotonin manchmal zwei Flecken auf, wobei einer innerhalb der organischen, der andere innerhalb der wässrigen Phase lag. Obwohl bei der mikrokristallinen Cellulose auch zwei Phasen auftraten, bildete sich für das Serotonin nur ein Fleck. Hingegen vermochte nur diese Cellulose optische Isomere zu trennen. Die D-Formen wiesen höhere R_f -Werte auf. Contractor ⁵⁸ trennte auf Cellulose von Whatman ebenfalls D, L-5-HTP, aber mit einem alkalischen Laufmittel. Es lässt sich daraus schliessen, dass die Trennung optischer Isomere auf Cellu-

lose nicht auf Ioneneffekte zurückzuführen ist, sondern auf die Eigenschaft der Cellulose, die L-Formen infolge sterischer Faktoren stärker zu binden.

Aldehyde wie Formaldehyd, p-Dimethylaminobenzaldehyd werden häufig zur qualitativen Analyse von Aminen herangezogen ^{142, 125, 124, 123, 122}. Doch ist der Mechanismus zur Bildung der Kondensationsprodukte nur teilweise untersucht worden. Vejdalek ⁸⁸ schreibt, dass Amine mit p-Dimethylaminobenzaldehyd oder DACA zu Schiff-schen Basen kondensieren. Dieser Mechanismus gilt auch für die Reaktion von 4-Aminoantipyrin mit DACA ¹²⁷. Doch wird hiermit nicht die Bildung eines blauen Farbstoffes des tertiären Amins Bufotenin mit DACA erklärt. Die gründliche Untersuchung von Dibbern ⁸⁹ zeigt, dass die Aldehydgruppe von p-Dimethylaminobenzaldehyd mit dem C-2-Atom des Indolringes reagieren kann. Je nach Säuregrad und oxydativen Bedingungen sind Nebenprodukte zu erwarten. Unter schwach sauren und oxydativen Bedingungen ist eine weitere Kondensation eines zweiten Indolringes mit dem Kohlenstoffatom der Aldehydgruppe möglich. Die optimalen Verhältnisse sind bei Reaktionen in Lösungen besser zu standardisieren als auf der Dünnschichtplatte, was die unterschiedlichen Ergebnisse von Platte zu Platte erklärt.

Die auf der Celluloseplatte gebildeten indolischen Kondensationsprodukte sind blau oder violett. Bei der Farbenentwicklung spielt der Substituent am C-3-Atom keine Rolle. Ausschlaggebend hierfür ist der Substituent am C-5-Atom. Dort plazierte Elektronendonatoren wie -OH, OCH₃ verursachen eine Blaufärbung. Nicht substituierte Indolringe an der C-5-Stellung sind violett. Nach Dibbern ⁸⁹ haben die in 5-Stellung substituierten Verbindungen eine abgeschwächte Reaktionsbereitschaft mit p-Dimethylaminobenzaldehyd. Dies konnte hier mit DACA nicht bestätigt werden. Nicht nur verlief die Reaktion für Serotonin schneller als für Tryptamin, sie ergab für das erste Amin auch einen stärker absorbierenden Farbstoff. Nach Dibbern ist der -I-Effekt der Hydroxygruppe des Serotonins für die reduzierte Reaktionsbereitschaft dieses Amins

verantwortlich. Dieser -I-Effekt ist nicht von der Hand zu weisen, doch wird er vom +M-Effekt des Sauerstoffs maskiert. Dies erklärt die von uns beobachtete erhöhte Reaktionsbereitschaft von Serotonin im Vergleich zu Tryptamin.

Die quantitative Bestimmung der Indolderivate erfolgte an Hand einer Eichkurve, die für jeden Test eigens ermittelt wurde. Aufgetragen wurde die Konzentration gegen die Peakfläche oder gegen das Papiergewicht des ausgeschnittenen Peaks. Für Serotonin, Bufotenin und Tryptophan wurden innerhalb gewisser Grenzen sowohl in Transmissions-, wie auch in Remissionsmessung Eichgeraden erhalten. Über einen grösseren Bereich wäre dies nur bei Einhaltung der Bedingungen des Lambert-Beerschen Gesetzes möglich. Die Flecken sind aber nicht gleichmässig homogen. Gleichmässigerer Flecken werden aber schon durch die Verwendung des Auftragegerätes von Waessle-Sandhoff erreicht. Obwohl im Bereich hoher Transparenz gemessen wurde, weichen die Eichkurven im höheren Bereich von der Geraden ab, da mit steigender Substanzmenge auch die Grösse der Flecken zunimmt ¹⁴³. Diese Fleckenform wird ausserdem durch das Laufmittel bestimmt, dessen genaue Zusammensetzung und Dampfdruck nicht immer eingehalten werden kann ¹³⁸. Shellard zeigte auch, dass die Eichkurven je nach Laufstrecke der gemessenen Verbindung von der Geraden abweichen, weshalb immer die gleiche Laufstrecke gewählt wurde.

Es wurde deshalb von verschiedenen Autoren vorgeschlagen, das Quadrat der Fläche der registrierten Kurve gegen die Substanzmenge ^{144, 145} oder die Peakfläche gegen die Quadratwurzel der aufgetragenen Substanzmenge ¹³⁸ oder gar die Quadratwurzel der registr. Fläche gegen den log der aufgetragenen Substanzmenge ¹⁴⁶ aufzutragen. Diese Vorschläge brachten aber zur densitometrischen Messung von 5-HT und Tryptophan keine wesentlichen Vorteile. Die auffallende Abweichung der Eichkurve von racemischem 5-HTP von einer Geraden ist auf die zunehmende Veränderung der Fleckenform mit ansteigender Substanzmenge zurückzuführen.

Wie die Abb. 10 zeigt, ist selbst für 120 ng noch keine Schwanzbildung für Serotonin festzustellen. Abweichungen der Eichkurve von einer Geraden sind auf optische Effekte zurückzuführen, weshalb ein Messbereich von 5-50 ng für blaugefärbte und 10-100 ng für violette Verbindungen der günstigste ist.

Die mit dieser Methode erhaltenen Werte von Serotonin und Tryptophan im Stammhirn der Ratte sind 1340 ± 175 ng/g resp. $5,35 \pm 0,55$ μ /g Gewebe. In der Literatur sind keine Werte für das Stammhirn beschrieben. Doch fand Maickel¹⁰⁸ für das Gesamthirn 550 ng/g, für das Mittelhirn 1230 ng/g. Curzon¹⁰⁹ ermittelte den Gehalt an Serotonin im Gesamthirn zu 830 ng/g, im Mittelhirn zu 1030 ng/g, im Hypothalamus zu 2640 ng/g. Beide Autoren verwendeten die OPT-Fluoreszenz-Methoden in verschiedenen Varianten. Shellenberger¹¹⁰ bestimmte 5-HT fluorimetrisch mit Ninhydrin. Für das Gesamthirn fand er 470 ng/g, für das Mittelhirn 941 ng/g. Tagliamonte⁵⁹ bekam bei der fluorimetrischen Bestimmung nach Denckla¹⁴⁷ einen Wert von $4,56 \mu$ /g für das Tryptophan im Gesamthirn.

2. Bestimmung radioaktiv markierter Verbindungen

Um eine grösstmögliche Empfindlichkeit zu erreichen, wurde die Anzahl Aufbereitungsschritte auf ein Minimum reduziert. Das Gemisch Methanol-Wasser extrahiert die chemisch verschiedenen Substanzgruppen wie Aminosäuren, Säuren und Amine in einem Schritt quantitativ, obwohl damit auf eine gewisse Spezifizität verzichtet werden musste. Doch trennt das Laufmittel A die zu bestimmenden Substanzen zufriedenstellend. Die Abb. 17 zeigt die äusserst geringe "Überlappung". Wird im Tierversuch 5-HTP appliziert, ist diese Aminosäure gegenüber den anderen Metaboliten im Überschuss nachweisbar. Der niedrige R_F -Wert von 5-HTP erweist sich deshalb als günstig, da somit die Verschleppung am geringsten ist.

Unter normalen Bedingungen sind von 5-HTP keine anderen Abbauewege als über Serotonin bekannt. Doch könnten von exogen zugeführtem 5-HTP auch andere Metaboliten entstehen. Ein mögliches Nebenprodukt ist 5-Hydroxykynurenin, das aus dem Angriff der Pyrrolase auf 5-HTP entstehen könnte ¹⁴⁸, wie in vitro gezeigt wurde.

Chase ¹⁴⁹ injizierte intracisternal über ein Microgramm Serotonin. Die neutralen Metabolite betrugen unter diesen Umständen 7 % des gemessenen 5-HIAA. Dies beweist, dass bei den vorliegenden Experimenten andere Metaboliten nicht in störenden Mengen auftreten würden.

Einzig von Jeffers ¹⁵⁰ wird ein Gerät vorgeschlagen, das die intracisternale Injektion erleichtern soll. Doch wurde auf die Verwendung des Gerätes verzichtet, da nur die Halterung der Tiere, nicht aber die Genauigkeit der Injektion verbessert wird. Beim genauen Injizieren in die Cisterna Magna sollte zum Zeitpunkt der Injektion die Menge an radioaktivem 5-HTP im Hirn gleich null sein. Nur selten, wenn die Ratte Gleichgewichtsstörungen aufweist, kann gesehen werden, dass das Einspritzen der Lösung nicht korrekt erfolgte. Die grosse Schwankungsbreite innerhalb der 5-HTP-Werte ist auf diesen Umstand zurückzuführen (Abb. 18).

Der höchste Wert wird für alle Metaboliten innerhalb der ersten halben Stunde erreicht (Abb. 18). Dieses Bild wurde auch nach intracisternaler Injektion von markiertem 5-HT ¹⁸ wie nicht radioaktivem 5-HT erhalten. Bereits eine halbe Stunde nach der Verabreichung von 5-HTP-C¹⁴ liegt der 5-HIAA-Spiegel doppelt so hoch wie der 5-HT-Spiegel (Tabelle 7). Chase ¹⁴⁹ zeigte, dass bereits 6 Minuten nach der intracisternalen Injektion von 5-HT-C¹⁴ der 5-HIAA-Wert um etwa 30 % höher liegt als der seiner Vorstufe. Es liegt demnach ein sehr schneller Abbau sowohl durch die MAO wie auch durch die Decarboxylase vor, der sogar eine Anhäufung von 5-HIAA bewirkt: Im Zeitraum von 0 - 2 h nach der Injektion weist die 5-HIAA-Kurve ein Plateau auf, obwohl endogenes 5-HIAA normalerweise sehr schnell aus dem Gewebe eliminiert wird.

Die Normalwerte von 5-HIAA im Rattenhirn zeigen, dass sie um 40 % unter dem 5-HT-Wert liegen ⁵⁵.

Im Zeitraum 1 - 7 h nach der Injektion ist ein gleichmässiger Abfall der drei Metaboliten festzustellen. Obwohl die 5-HIAA-Kurve hier steiler verläuft als die 5-HT-Kurve, bleiben die 5-HIAA-Werte immer noch über den Serotoninwerten. Der Abbau von 5-HTP und 5-HT ist also immer noch unphysiologisch hoch.

Dass der Abbau von 5-HTP-C¹⁴ unter diesen Bedingungen nicht in vollem Masse den physiologischen Verhältnissen entspricht, zeigt sich auch in der autoradiographischen Studie. Die Aminosäure tritt vom Liquorraum in das Gewebe ein, doch nur teilweise spezifisch an den Stellen, an denen 5-HTP endogen synthetisiert wird. Es lässt sich mit dem Bild vergleichen, das nach intravenöser Injektion von 5-HTP erhalten wird ⁵⁰. Eine spezifische Anhäufung von 5-HTP wird nach demselben Autor nur nach Hemmung der Decarboxylase erhalten. Ausserdem wies Lichtensteiger ¹⁵¹ histochemisch nach, dass nach 5-HTP-Gabe eine Aufnahme von Serotonin in catecholaminerge Neuronen des ZNS stattfindet. Mit anderen Methoden kommen Brodie ⁶⁸ und Shaskan ¹⁵³ und Fuxe ¹⁵⁵, Ng ¹⁵⁶ zum selben Befund.

Wie sich das Serotonin in freies und gespeichertes aufspaltet, konnte in dieser vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Doch wurde mit Pargylin eine Erhöhung des Amins um das Sechsfache erreicht (Tabelle 8). Das neu synthetisierte Amin der Kontrolltiere befindet sich hiermit wohl in den Nervenzellen, wird aber nur in geringem Masse gespeichert. Andere Autoren haben nämlich mit Pargylin einen kleineren Anstieg von Serotonin erhalten. Maruyama ⁸⁹ erzielte mit einer Dosis von 75 mg/kg Pargylin i.p. nach zwei Stunden nur einen Anstieg des Amins um das zweieinhalbfache. Über ein ähnliches Ergebnis berichtet Valzelli ¹⁵², der 5-HT vier Stunden nach einer Dosis von 150 mg/kg Pargylin i.p. im Hirn von Ratten bestimmte.

Zum gleichen Zeitpunkt, an dem mit MAO-Hemmer vorbehandelte Tiere getötet wurden, nämlich zwei Stunden nach der 5-HTP-C¹⁴-Gabe, wurde eine andere, mit Ro 4-1284 vorbehandelte Gruppe von Tieren getötet (Tabelle 8). Diese Tiere wiesen im Vergleich zu den Kontrolltieren einen signifikant niedrigeren 5-HT-Spiegel auf. Da Ro 4-1284 selektiv die Aminspeicher angreift, kann gefolgert werden, dass doch ein gewisser Teil des 5-HT-C¹⁴ der Kontrolltiere in die synaptischen Vesikel aufgenommen wird.

Moir⁵⁵ injizierte Hunden intravenös L-5-HTP oder D, L-5-HTP in gleichen Mengen. Bei der ersten Gruppe lag der cerebrale 5-HTP-Spiegel nach einer Stunde doppelt so hoch wie der der zweiten Gruppe. Unter diesen Versuchsbedingungen wird die D-Form kaum ins Hirn aufgenommen. Sie wird nur zu einem geringen Teil dekarboxyliert¹⁵⁴. Es wurde deshalb qualitativ die Aufnahme von D-5-HTP ins Hirn ermittelt. Die Abb. 27 zeigt, dass das chromatographierte Hirnextrakt mit D, L-5-HTP-C¹⁴ auf der Höhe des R_f-Wertes von D-L-HTP eine Blaufärbung zeigt. Es ist deshalb anzunehmen, dass wenigstens ein Teil der D-Form vom Liquor ins Hirn gelangt. Die hier aus der Steigung der D, L-5-HTP-Kurve ermittelte Syntheserate von 5-HT stimmt deshalb nur zufällig mit den Literaturwerten überein. Die wahre Syntheserate des Amins kann daraus nicht ermittelt werden, da auch Ausschwemmeffekte in die 5-HTP-Kurve eingehen.

Die hier ermittelten Halbwertszeiten für D, L-5-HTP (3,5 h) und scheinbaren Halbwertszeiten für Serotonin (2 h) und für 5-HIAA (1 h 35') wurden mit den Ergebnissen anderer Autoren verglichen. Da konstant neues 5-HT aus 5-HTP synthetisiert wird, liegt die wahre Halbwertszeit von Serotonin niedriger.

Brodie⁶⁸ injizierte Kaninchen 50 mg/kg D, L-5-HTP i.v. und bestimmte 5-HT im Hirnstamm. Der 5-HT-Spiegel betrug drei Stunden nach der Injektion nur noch die Hälfte von dem nach einer Stunde gemessenen. Hier zeigen sich sowohl hinsichtlich der Applikationsart wie auch der Dosis keine Unterschiede zur vorliegenden Untersuchung.

Moir ⁵⁵ gab Ratten 10 mg/kg D, L-5-HTP i.p., um festzustellen, dass das 5-HT im Hirn nicht messbar anstieg. Ein Anstieg wurde erst nach doppelter Dosis bemerkbar. In beiden Fällen stieg die 5-HIAA um über 500 % an. Diese Versuche wie auch die in der vorliegenden Arbeit weisen daraufhin, dass mit 5-HTP, unabhängig von der Applikationsart, eine unspezifische Steigerung des Serotoninstoffwechsels erhalten wird. Bei Gabe von Tryptophan ist ebenfalls eine ubiquitäre Verteilung dieser Aminosäure zu erwarten, doch findet ihr Metabolismus in spezifisch serotonergen Neuronen statt. Dies ist gerade bei einer Therapie mit Tryptophan ²⁶ oder 5-HTP ¹⁵⁷ wichtig. In beiden Fällen ist die Einnahme mit Nebenwirkungen verbunden, aber insbesondere nach 5-HTP. Obwohl die therapeutische Dosis von 5-HTP niedriger liegt als die von Tryptophan, muss berücksichtigt werden, dass die 5-HT-Zunahme im Hirn nur für kurze Zeit anhält. Da die Halbwertszeit von aus appliziertem 5-HTP gebildetem 5-HT weniger als zwei Stunden beträgt, muss 5-HTP zur Erreichung eines steady-state-levels von 5-HT mehrmals täglich appliziert werden.

3. Einfluss von Imipramin auf den Abbau von intracisternal injiziertem 5-HT-C¹⁴ und 5-HTP-C¹⁴.

Im letzten Abschnitt wurde gezeigt, dass 5-HTP nach intracisternaler Injektion ins Hirn aufgenommen und rasch metabolisiert wird. Das aus der Aminosäure synthetisierte 5-HT-C¹⁴ wird zum grössten Teil intraneuronal von der MAO abgebaut und nur zu einem geringen Teil gespeichert. Daraus kann geschlossen werden, dass intracisternal injiziertes 5-HT teilweise in die Nervenendigung, aber wiederum nur zu einem gewissen Prozentsatz in die synaptischen Vesikel aufgenommen wird. Imipramin vor dem Amin appliziert (Tabelle 9), bewirkt einen reduzierten Abbau von Serotonin. Es kann daraus geschlossen werden, dass das Amin sich extraneuronal

anhäuft, da das abbauende Enzym MAO innerhalb der Nervenendigung die grösste Aktivität aufweist.⁵⁶

Schildkraut¹⁸ studierte ebenfalls die Wirkung von Imipramin auf intracisternal injiziertes, radioaktives Serotonin. Die beiden Experimente werden miteinander verglichen:

<u>SCHILDKRAUT</u> ¹⁸		<u>BAUMANN</u> (Tabelle 9)	
Zeit	Droge etc.	Zeit	Droge etc.
-60'	25 mg/kg Imip	-15'	40 mg/kg Imip
0	0,5-2 γ 5-HT-C ¹⁴	0	115 ng 5-HT-C ¹⁴
+60'	Dekapit.	+30'	Dekapit.
Veränderungen gegenüber Kontrollen			
5-HT	+20 %	+35 %	
5-HIAA	0 %	0 %	

Meek¹⁵⁸ findet ebenfalls eine Zunahme von intracerebral injiziertem radioaktivem Serotonin nach Vorbehandlung mit Imipramin. Nach einem Experiment, in dem er die Tiere bereits zehn Minuten nach Applikation des Amins tötet und keine Unterschiede feststellt, schliesst er die Hemmung der Aufnahme des Amins durch das Thymoleptikum aus. In diesem Zeitintervall sei die entscheidende Phase der Aufnahme. Doch muss dem entgegengesetzt werden, dass zu diesem Zeitpunkt die lokale Anhäufung des Amins an der Injektionsstelle noch überwiegt und seine Aufnahme vom extracellulären Amin maskiert wird.

Um jedoch den Einfluss von Imipramin auf intraneuronales Serotonin zu untersuchen, wurde die Vorstufe appliziert, die vor allem im Cytoplasma dekarboxyliert wird. Doch lassen die in den Abb. 22 und 23 dargestellten Versuche keine Wirkungen von Imipramin auf den Abbau von 5-HTP-C¹⁴ erkennen. Der nicht signifikant erhöhte 5-HTP-Wert (Abb. 23) lässt eine Hemmung der Aufnahme der Amino-

säure durch die Droge nur vermuten, da in diesem Falle der Serotoninspiegel erniedrigt sein müsste.

Wird Imipramin vor 5-HTP appliziert, so könnte eventuell geklärt werden, ob die Droge die Aufnahme der Aminosäure in die Nervenendigung hemmt. Die in den Abb. 24 und 24 a wiedergegebenen Experimente erlauben aber wiederum keine eindeutigen Erklärungen. Möglicherweise infolge der grossen statistischen Schwankungsbreite der 5-HTP-Werte ist der Einfluss der Droge nicht erkennbar. Doch fällt auf, dass beim - 2-Stunden-Wert der 5-HIAA-Spiegel im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht, beim + 1-Stunden-Wert aber signifikant erniedrigt ist. Wird Imipramin vier Stunden vor der Dekapitation gespritzt, könnte nach der Hypothese von Carlsson eine Hemmung der Freisetzung des endogenen Serotonins durch die Droge stattfinden. Die Aufnahme von 5-HT-C¹⁴ in die synaptischen Vesikel könnte verhindert werden. Dies zeigt sich durch einen verstärkten Abbau des Amins und im erhöhten 5-HIAA-Spiegel (Abb. 24). Doch muss der 5-HT-Spiegel nicht erniedrigt sein, da im Gegensatz zu dem in Tabelle 9 wiedergegebenen Versuch neues 5-HT-C¹⁴ laufend neu synthetisiert wird.

Für den 1-h-Wert ist vor der Applikation von Imipramin ein gewisser Anteil von 5-HT schon gespeichert. Seine Freisetzung, somit sein Abbau wird von Imipramin verhindert, was sich im erniedrigten 5-HIAA widerspiegelt.

Diese Erklärung würde zu den eingangs erläuterten Thesen von Carlsson^{103, 101} passen, wonach Imipramin einerseits die Aufnahme von extraneuralem 5-HT, andererseits aber die Freisetzung von gespeichertem Serotonin hemmt.

Die Hemmung der Aufnahme von Serotonin durch Drogen des Typs Imipramin oder Chlorimipramin wird nicht nur von Carlsson^{101, 159}, sondern auch von Lidbrink¹⁰⁴ gezeigt. Mittels eines Synthesehemmers kann Corrodi^{106, 160} die These bekräftigen, wonach Imipramin den Umsatz von Serotonin verlangsamt. Doch konnte bisher

nur Kivalo ¹⁶¹ eine Erhöhung des endogenen Serotoninspiegels durch Imipramin nachweisen.

Scheint die Tatsache, dass Imipramin die Aufnahme von Serotonin blockiert, gesichert zu sein, so muss die Theorie der Verlangsamung des Umsatzes von Serotonin durch Imipramin noch durch weitere Experimente bestätigt werden.

Gerade im Hinblick auf die therapeutische Wirkung von Imipramin sind chronische Versuche notwendig, wie sie von Schildkraut ¹⁶² für den Noradrenalin- und von Alpers ⁵⁷ für den Serotonin- und Noradrenalinstoffwechsel ausgeführt wurden.

Zusammenfassung

1. Es wurde eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Mikromengen Serotonin (10 ng), Tryptophan (20 ng), sowie anderer Indolderivate im Rattenhirn ausgearbeitet.
2. Sie beruht auf der Trennung der im Gewebeextrakt gelösten Metaboliten mittels Dünnschichtchromatographie auf Cellulose. Die mit dem DACA-Reagens angefärbten Substanzen wurden densitometrisch gemessen.
3. Mit dieser Methode wurde Tryptophan und Serotonin quantitativ im Stammhirn der Ratte bestimmt.
4. Mit der gleichen Extraktionsmethode und anschließender Chromatographie wurde die Bestimmung von radioaktiv markierten 5-Hydroxytryptophan und seiner Metaboliten ermöglicht. Die an der Cellulose absorbierten Substanzen werden im Szintillationszähler quantitativ gemessen.
5. Diese Methode erlaubte die Beobachtung des Verlaufs des Abbaus von 5-Hydroxytryptophan- C^{14} nach intracisternaler Injektion im Rattenhirn: Bereits innerhalb der ersten halben Stunde erreichten die Metaboliten 5-HTP- C^{14} , 5-HT- C^{14} und 5-HIAA- C^{14} die höchsten Werte. Im Zeitraum 1 - 7 Stunden nach der Injektion verliefen die Kurven der Metaboliten annähernd abnehmend exponentiell. Unter diesen Bedingungen ermittelte sich die Halbwertszeit von Serotonin zu weniger als zwei Stunden.
6. Die Aufnahme von 5-HTP- C^{14} und 5-HT- C^{14} wurde autoradiographisch verfolgt. Die radioaktiven Verbindungen drangen bis zu den angrenzenden Gebieten des dritten Ventrikels.
7. Pargylin und Ro 4-1284 erhöhten bzw. erniedrigten den 5-HT- C^{14} -Spiegel. Die Ergebnisse weisen daraufhin, dass nur ein Teil

des neu synthetisierten 5-HT-C¹⁴ gespeichert, der grösste Teil aber von der MAO abgebaut wird.

8. Es wurde der Einfluss von Imipramin auf den Abbau von intracisternal injiziertem 5-HTP-C¹⁴ untersucht. Es konnte keine Hemmung der Aufnahme der Aminosäure ins Hirn durch diese Droge nachgewiesen werden. Die verschiedenen 5-HIAA-Werte könnten auf eine Hemmung der Aufnahme von 5-HT-C¹⁴ in die Nervenendigung beziehungsweise auf die Hemmung der Freisetzung von 5-HT aus den synaptischen Vesikeln durch Imipramin hinweisen.

1. Thompson, J.H.: Res. Commun. in Chem. Pathol. and Pharmacol. 2, 687 (1971).
2. Pletscher, A., M. Da Prada, K.H. Berneis, J.P. Tranzer: Experientia. 27, 993 (1971).
3. Baldessarini, R.J.: Ann. Rev. Med. 23, 343 (1972).
4. Aghajanian, G.K.: Neurosci. Res. Prog. Bull. 8 (1), 40 (1970).
5. Aghajanian, G.K., H.J. Haigler, F.E. Bloom: Life Sci. 11, 615 (1972).
6. Matussek, N.: Fortschr. d. Med. 12, 515 (1967).
7. Héry, F., E. Rouer, J. Glowinski: Brain Res. 43 (2), 445 (1972).
8. Grahame-Smith, D.G.: J. Neurochem. 18, 1053 (1971).
9. Jouvét, M.: Science. 163, 32 (1969).
10. Tabushi, K., H.E. Himwich: Biol. Psychiat. 2, 183 (1970).
11. Taborski, R.G.: Experientia. 27, 929 (1971).
12. Sabelli, H.C., W.J. Giardina: Biol. Psychiat. 2, 119 (1970).
13. Matussek, N.: Umschau. 12, 400 (1966).
14. Ploog, D.: Nervenarzt. 35, 166 (1964).
15. Curzon, G., A.R. Green: Br. J. Pharmac. 43, 39 (1971).
16. Curzon, G., A.R. Green: Br. J. Pharmac. 39, 653 (1970).
17. Deguchi, T., J. Barchas: J. Neurochem. 19, 927 (1972).
18. Schildkraut, J.J., S.M. Schanberg, G.R. Breese, I.J. Kopin: Biochem. Pharmacol. 18, 1971 (1969).
19. Ackenheil, M.: Inaugural-Dissertation, München (1968).
20. Valzelli, L.: Actual. Pharmacol. 24, 133 (1971).
21. Labhsetwar, A.P.: Acta Endocr. 68, 334 (1971).
22. Essman, W.B.: Transact. N.Y. Acad. Sci. 32 (8), 948 (1970).

23. Essman, W.B.: In: *Biology of Memory*. G. Adam. Plenum Press, 213 (1971).
24. Aprison, M.H., J.N. Hingtgen: *Fed. Proceed.* 31, 121 (1972).
25. Matussek, N.: In: *Das depressive Syndrom*. Eds.: H. Hippus, H. Selbach. Urban & Schwarzenberg, München (1969).
26. Coppen, A.: *Adv. Ment. Sci.* 4, 123 (1971).
27. Coppen, A., A.J. Prange, P.C. Whybrow, R. Noguera: *Arch. Gen. Psychiat.* 26, 474 (1972).
28. Coppen, A., B.W.L. Brooksbank, M. Peet: *The Lancet.* I (7765), 1393 (1972).
29. Mendels, J., A. Frazer, R.G. Fitzgerald, T.A. Ramsey, J.W. Stokes: *Science.* 175, 1380 (1972).
30. Praag, H.M. van, J. Korf: *Psychopharmacol.* 19, 148 (1971).
31. Brodie, B.B., F. Sulser, E. Costa: *Ann. Rev. Med.* 12, 349 (1961).
32. Balestrieri, A.: *Giornale Psichiat. Neuropat.* (I) (1969).
33. Schildkraut, J.J., I.J. Kopin, S.M. Schanberg, J. Durell: *Pharmakopsychiat.* 2, 69 (1968).
34. Meyer, H.H.: *Fortschr. Neurol. Psychiat.* (2), 61 (1968).
35. Klerman, G.L.: *Adv. Ment. Sci.* 4, 379 (1971).
36. Schuckit, M., E. Robins, J. Feighner: *Arch. Gen. Psychiat.* 24, 509 (1971).
37. Dunner, D.L., F.K. Goodwin: *Arch. Gen. Psychiat.* 26, 364 (1972).
38. McLeod, W.R., M.F. McLeod: *Aust. N.Z.J. Psychiat.* 5, 289 (1971).
39. Fernstrom, J.D., R.J. Wurtman: *Science.* 173, 149 (1971).
40. Saavedra, J.M., J. Axelrod: *Science.* 172, 1365 (1972).
41. Saavedra, J.M., J. Axelrod: In press.
42. Narasimhachari, N., J.M. Plaut, H.E. Himwich: *Life Sci.* 11, II, 221 (1972).
43. Mandell, A.J., M. Morgan: *Nature New Biol.* 230, 85 (1971).

44. Narasimhachari, N., B. Heller, J. Spaide, L. Haskovec,
M. Fujimori, K. Tabushi, H.E. Himwich: Biol. Psychiat.
3, 9 (1971).
45. Narasimhachari, N., B. Heller, J. Spaide, L. Haskovec,
H. Metzger, M. Strahilevitz, H.E. Himwich: Biol.
Psychiat. 3, 21 (1971).
46. Sjoerdsma, A., H. Weissbach, L.L. Terry, S. Udenfriend: Amer.
J. Med. 23, 5 (1957).
47. Sjoerdsma, A., W. Lovenberg, G.L. Gessa. Internal Med. 73,
607 (1970).
48. Bulat, M., Z. Supek: J. Neurochem. 14, 265 (1967).
49. Bulat, M., Z. Supek: J. Neurochem. 15, 383 (1968).
50. Bédard, P., A. Carlsson, K. Fuxe: Neunyn-Schmiedeberg's Arch.
Phar. 269, 1 (1971).
51. Freter, K., H. Weissbach, S. Udenfriend, B. Witkop: Proc. Soc.
exp. Biol. Med. 94, 725 (1957).
52. Gal, E.M., J.C. Armstrong, B. Ginsberg: J. Neurochem. 13, 643
(1966).
53. Udenfriend, S., E. Titus: In: Amino Acid Metabolism. Eds.:
W.D. Mc Elroy, B. Glass. John Hopkins Press, Baltimore
(1955).
54. Knapp, S., A.J. Mandell: Life Sci. 11, 761 (1972).
55. Moir, A.T.B., D. Eccleston: J. Neurochem. 15, 1093 (1968).
56. Seiler, N., L. Demisch, H. Schneider: Angew. Chem. 83, 53 (1971).
57. Hilma, S., A. Himwich, H.E. Himwich: J. Pharmacol. exp. Ther.
180, 531 (1972).
58. Contractor, S.F., J. Wragg: Nature. 208, 71 (1965).
59. Tagliamonte, A., P. Tagliamonte, J. Perez-Cruet, G.L. Gessa:
Nature New Biol. 229, 125 (1971).
60. Hidaka, H., T. Nagatsu, K. Yagi: J. Neurochem. 16, 783 (1969).
61. Gal, E.M.: Brain Res. 44, 309 (1972).

62. Mc Lennan: Neurosci. Res. Prog. Bull. 5 (1), 64 (1967).
63. Taxi, J.: La Recherche. 2, 41 (1971).
64. Shore, P.A.: Ann. Rev. Pharmacol. 12, 209 (1972).
65. Häggendal, J., A. Dahlström: Memoirs of the Soc. for Endocrin. 19, 651 (1971).
66. Meek, J.L., N.H. Neff: J. Neurochem. 19, 1519 (1972).
67. Aghajanian, G.K.: Ann. Rev. Pharmacol. 12, 157 (1972).
68. Brodie, B.B., M.S. Comer, E. Costa, A. Dlabac: J. Pharmacol. exp. Ther. 152, 340 (1966).
69. Jost, J.P., H.V. Rickenberg: Ann. Rev. Biochem. 40, 741 (1971).
70. Fumagalli, R., V. Bernareggi, F. Berti, M. Trabucchi: Life Sci. 10, 1111 (1971).
71. Green, J.P., S. Kang, S. Margolis: Memoirs of the Soc. for Endocrin. 19, 727 (1971).
72. Snyder, S.H., A.T. Schulgin: Neurosci. Res. Prog. Bull. 8 (1), 86 (1970).
73. Henn, F.A., A. Hamberger: Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 2686 (1971).
74. Héry, F., J.F. Pujol, M. Lopez, J. Mâcon, J. Glowinski: Brain Res. 21, 391 (1970).
75. Kleiber, M.: Nature. 175, 342 (1955).
76. Mawson, C.A.: Nature. 176, 317 (1955).
77. Zilversmit, D.B.: Nature. 175, 863 (1955).
78. Costa, E.: Chemistry and Brain Development. Plenum Press. 157 (1971).
79. Millard, S.A., E. Costa, E.M. Gal: Brain Res. 40, 545 (1972).
80. Mâcon, J.B., L. Sokoloff, J. Glowinski: J. Neurochem. 18, 323 (1971).
81. Hamon, M. S. Bourgoïn, Y. Morot-Gaudry, J. Glowinski: Nat. New Biology. 237, 184 (1972).

82. Shen, F.-H., H.H. Loh, E.L. Way: J. Pharmacol. exp. Ther. 175, 427 (1970).
83. Maruyama, Y., G. Hayashi, S.E. Smits, A.E. Takemori:
J. Pharmacol. exp. Ther. 178, 20 (1971).
84. Lin, R.C., E. Costa, N.H. Neff, C.T. Wang, S.H. Ngai:
J. Pharmacol. exp. Ther. 170, 232 (1969).
85. Neff, N.H., P.F. Spano, A. Groppetti, C.T. Wang, E. Costa:
J. Pharmacol. exp. Ther. 175, 701 (1971).
86. Korf, J., H.M. van Praag, J.B. Sebens: Brain Res. 42, 239
(1972).
87. Neff, N.H., T.N. Tozer, B.B. Brodie: J. Pharmacol. exp. Ther. 158, 214 (1967).
88. Vejdalek, Z.J., B. Kakac: Farbreaktionen in der Spektrophot.
Analyse org. Verb. Band I. Fischer Verl. Jena (1969).
89. Dibbern, H.W., H. Rochelmeyer: Arzneimittelforsch. 13, 7 (1963).
90. Wyatt, R.J., T. Vaughan, M. Galanter, J. Kaplan, R. Green:
Science. 177, 1124 (1972).
91. Pollin, W., P.V. Cardon, S.S. Kety: Science. 133, 104 (1961).
92. Lauer, J.W., W.M. Inskip, J. Bernsohn, A. Zeller: Arch. Neurol.
Psych. 80, 122 (1958).
93. Matussek, N.: In: Die Infusionsbehandlung von depressiven
Kranken. J. Kugler, H. Lechner, D. Fontanari. Verlag
Ulrich Moser, Graz (1970).
94. Perez-Cruet, J., A. Tagliamonte, P. Tagliamonte, G.L. Gessa:
J. Pharmacol. exp. Ther. 178, 325 (1971).
95. Goridis, C., N.H. Neff: J. Neurochem. 18, 1673 (1971).
96. Erwin, V.G., R.A. Deitrich: Molecular Pharmacol. 7, 219 (1971).
97. Halaris, A., E. R  ther, N. Matussek: Zeitschr. f. Zellforschung.
76, 100 (1967).
98. H  ggendal, J., A. Dahlström: J. Pharm. Pharmac. 23, 81 (1971).

99. Domenjoz, R., W. Theobald: Arch. Int. Pharmacodyn. Thér.
120, 450 (1959).
100. Angst, J., W. Theobald: Tofranil. Stämpfli Verlag, Bern (1970).
101. Carlsson, A., J. Jonason, M. Lindqvist: J. Pharm. Pharmac.
21, 769 (1969).
102. Blackburn, K.J., P.C. French, R.J. Merrills: Life Sci. 6,
1653 (1967).
103. Carlsson, A., K. Fuxe, U. Ungerstedt: J. Pharm. Pharmac. 20,
150 (1968).
104. Lidbrink, P., G. Jonsson, K. Fuxe: Neuropharmacol. 10, 521
(1971).
105. Meek, J.L., K. Fuxe: Biochem. Pharmacol. 20, 693 (1971).
106. Corrodi, H., K. Fuxe: J. Pharm. Pharmac. 20, 230 (1968).
107. Udenfriend, S.: Fluorescence Assay in Biology and Medicine.
I, II. Academic Press, New York (1962, 1969).
108. Maickel, R.P., R.H. Cox, J. Saillant, F.P. Miller: Int. J.
Neuropharmacol. 7, 275 (1968).
109. Curzon, G., A.R. Green: Brit. J. Pharmac. 39, 653 (1970).
110. Shellenberger, M.K., J.H. Gordon: Anal. Biochem. 39, 356 (1971).
111. Nishino, M., T. Noguchi, R. Kido: Anal. Biochem. 45, 314 (1972).
112. VandenHeuvel, W.J.A.: J. Chromatog. 36, 354 (1968).
113. Narasimhachari, N., J. Spaide, B. Heller: J. Chromatog. Sci.
9, 502 (1972).
114. Degen, P.H., J.R. DoAmaral, J.D. Barchas: Anal. Biochem. 45,
634 (1972).
115. Narasimhachari, N., J.M. Plaut, K.Y. Leiner: Biochem. Med.
5, 304 (1971).
116. Narasimhachari, N., J. Plaut: J. Chromatog. 57, 433 (1971).
117. Pilet, P.E., M. Fragata: Physiol. Vég. 4, 379 (1966).
118. Seiler, N.: J. Chromatog. 63, 97 (1971).

119. Wässle, W.: Inaugural-Dissertation, München (1970).
120. Heathcote, J.G., D.M. Davies, C. Haworth: J. Chromatog. 60, 103 (1971).
121. Geissler, H.E., E. Mutschler: J. Chromatog. 56, 271 (1971).
122. Pillay, D.T.N., R. Mehdi: J. Chromatog. 32, 592 (1968).
123. Glombitza, K.W.: J. Chromatog. 25, 87 (1966).
124. Cowles, E.J., G.M. Christensen, A.C. Hilding: J. Chromatog. 35, 389 (1968).
125. Stahl, E., H. Kaldewey: Hoppe-Seylers Z. f. Physiol. Chemie. 323, 182 (1961).
126. Harley-Mason, J., A.A.P.G. Archer: Biochem. J. 69, 60p (1958).
127. Strell, M., S. Reindl: Arzneimittelforsch. 11, 552 (1961).
128. Heacock, R.A., M.E. Mahon: J. Chromatog. 17, 338 (1965).
129. Matthias, F.R.: Klin. Wschr. 50, 243 (1972).
130. Fischer, C.A., M.H. Aprison: Anal. Biochem. 46, 67 (1972).
131. Ho, B.T., D. Taylor: Biochem. Med. 5, 521 (1971).
132. Sapira, J.D., T. Klaniecki, M. Rizk: Clin. Chem. 17, 486 (1971).
133. Feldstein, A., K.K. Wong: Anal. Biochem. 11, 467 (1965).
134. Klein, D.C., A. Notides: Anal. Biochem. 31, 480 (1969).
135. Beckett, A.H., N.H. Choulis: Vorträge u. Originalmitteilg. 23. Int. Kongr. Pharm. Wiss., Münster. 627 (1963).
136. Giese, J., E. Rüther, N. Matussek: Life Sci. 6, 1975 (1967).
137. Stahl, E.: Dünnschichtchromatographie. Springer Verlag, Berlin (1969).
138. Shellard, E.J., M.Z. Alam: J. Chromatog. 33, 347 (1968).
139. Aghajanian, G.K., F.E. Bloom, R.A. Lovell, M.H. Sheard, D.X. Freedman: Biochem. Pharmacol. 15, 1401 (1966).
140. Tanimukai, H., R. Ginther, J. Spaide, J.R. Bueno, H.E. Himwich: Life Sci. 6, 1697 (1967).

141. Tanimukai, H.: J. Chromatog. 30, 155 (1967).
142. Ballin, G.: J. Chromatog. 16, 152 (1964).
143. Klaus, R.: J. Chromatog. 16, 311 (1964).
144. Schunack, W., E. Eich, E. Mutschler, H. Rochelmeyer: Arzneimittelforsch. 19, 1756 (1969).
145. Eich, E., H. Geissler, E. Mutschler, W. Schunack: Arzneimittelforsch. 19, 1895 (1969).
146. Seiler, N., H. Moeller: Chromatographia 2, 319 (1969).
147. Denckla, W.D., H.K. Dewey: J. Lab. Clin. Med. 69, 160 (1967).
148. Tsuda, H., T. Noguchi, R. Kido: J. Neurochem. 19, 887 (1972).
149. Chase, T.N., R.I. Katz, I.J. Kopin: Neuropharmacol. 9, 103 (1970).
150. Jeffers, W.A., J.Q. Griffith: Jr. in the Rat in Lab. Investigation. Eds.: W.A. Farris, J.Q. Griffith. Hafner London, 196 (1967).
151. Lichtensteiger, W., U. Mutzner, H. Langemann: J. Neurochem. 14, 489 (1967).
152. Valzelli, L., S. Garattini: J. Neurochem. 15, 259 (1968).
153. Shaskan, E.G., S.H. Snyder: J. Pharmacol. exp. Ther. 175, 404 (1970).
154. Oates, J.A., A. Sjoerdsma: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 108, 264 (1961).
155. Fuxe, K., L.L. Butcher, J. Engel: J. Pharm. Pharmac. 23, 420 (1971).
156. Ng, L.K.Y., T.N. Chase, R.W. Colburn, I.J. Kopin: Brain Res. 45, 499 (1972).
157. Sano, I.: Münchner Med. Wchschr. 114, 1713 (1972).
158. Meek, J.L., A.R. Krall, M.A. Lipton: J. Neurochem. 17, 1627 (1970).
159. Carlsson, A., J. Jonason, M. Lindqvist, K. Fuxe: Brain Res. 12, 456 (1969).

160. Corrodi, H., K. Fuxe: *Europ. J. Pharmacol.* 7, 66 (1969).
161. Kivalo, E., U.K. Rinne, H. Karinkanta: *J. Neurochem.* 8, 105 (1961).
162. Schildkraut, J., A. Winokur, P.R. Draskoczy, J.H. Hensle:
Amer. J. Psychiat. 127, 1032 (1971).
163. Schubert, P., W. Ladisich: *Psychopharmacol.* 15, 189 (1969).
164. Garattini, S., L. Valzelli: *Serotonin*, Elsevier, Amsterdam (1967).

Lebenslauf

Am 16. März 1944 wurde ich in Luzern (Schweiz) geboren. Ich besuchte die Primarschule in Zürich, das Gymnasium in Sarnen und Lausanne, wo ich das Mittelschulstudium im Jahre 1963 mit der Matura Typ C (Mathematik, Naturwissenschaften) abschloss. Im Herbst 1963 begann ich mein Chemiestudium an der Universität Basel, das ich 1968 mit dem Diplom in Chemie beendete. Von Juni 1968 bis Dezember 1971 arbeitete ich am experimentellen Teil der vorliegenden Doktorarbeit in der neurochemischen Abteilung, Arbeitsgruppe für Psychopharmakologie, des Max-Planck-Institutes für Psychiatrie, München, unter der Aufsicht von Herrn Prof. Dr. F. Lynen und unter der Anleitung von Herrn Priv. Doz. Dr. N. Matussek. Seit Januar 1971 arbeite ich im Centre de Recherche Psychopathologique (Leitung: Prof. Dr. H. Heimann) der Clinique Psychiatrique Universitaire in Prilly/Lausanne (Schweiz). Von August bis Dezember 1972 hielt ich mich im State Research Hospital Galesburg/Ill (USA) (Leitung: Prof. Dr. H.E. Himwich) für einen Studienaufenthalt auf. Seit 1968 bin ich verheiratet und habe zwei Kinder.

